



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

Estimación de las frecuencias INDEL (I/D) del gen
***ECA* en 4 muestras de la población peruana**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Nataly Andrea MARRUFFO FERNÁNDEZ

ASESOR

Margarita Rosa Eugenia VELÁSQUEZ REINOSO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Marruffo, N. (2016). *Estimación de las frecuencias INDEL (I/D) del gen ECA en 4 muestras de la población peruana*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

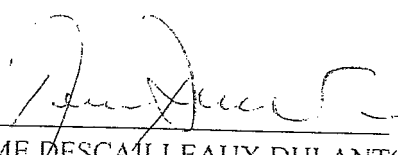
Siendo las 15:10 horas del 14 de abril de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **NATALY ANDREA MARRUFFO FERNÁNDEZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 016-EAPGB-2015, la titulando expuso su tesis: **"ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS INDEL (I/D) DEL GEN ECA EN 4 MUESTRAS DE LA POBLACIÓN PERUANA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: sobresaliente con mención

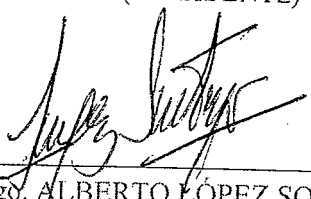
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **NATALY ANDREA MARRUFFO FERNÁNDEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

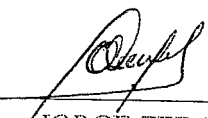
Siendo las 16:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 14 de abril de 2016.


Mg. JAIME DESCAILLEAUX DULANTO
(PRESIDENTE)


Blga. MARGARITA VELASQUEZ REMOSO
(ASESORA)


Blgo. ALBERTO LÓPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)


Blgo. JORGE ZEBALLOS ALVA
(MIEMBRO)

A César y Elvia...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento al proyecto CON/CON N° 131001191, el cual me permitió trabajar esta tesis.

A la Blga. Margarita Velásquez por su confianza, por sus consejos y su tiempo. Por incentivarme a culminar la tesis y además aceptar ser mi asesora. Al Mg. Jaime Descailleaux por abrirme las puertas del laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM. A ambos, gracias por hacerme sentir siempre en familia.

A todos mis compañeros del laboratorio por brindarme su apoyo, en especial a los genetistas Francisco Sánchez y Alexis Murillo. Al Blgo. Saúl Lindo por motivarme, con el ejemplo, a no rendirme frente a las adversidades y luchar por mis sueños.

A todos los donantes de muestra, quienes sin su apoyo no hubiese sido posible la realización de este estudio: alumnos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y alumnos de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión de la ciudad de Huacho. Al Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín, por el apoyo en la toma de muestras de las poblaciones de Monsefú y Moche.

A mis padres por ser mi ejemplo y darme todo su apoyo siempre, sin ustedes no habría llegado a este punto de mi vida. Gracias por todo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	5
2.1.1 Función fisiológica de la ECA.....	5
2.1.2 Isoformas de la ECA	7
2.1.3 Inhibidores de la ECA	8
2.2 El gen <i>ECA</i>	9
2.2.1 Polimorfismos existentes en el gen <i>ECA</i>	10
2.2.1.1 Polimorfismo I/D en el gen <i>ECA</i>	12
2.2.1.1.1 Polimorfismos I/D y enfermedades asociadas	14
2.2.1.1.2 Estudios del polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i> en poblaciones peruanas.....	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
3.3 Variables.....	17
3.3.1 Definición de las variables.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Materiales	19
4.1.1 Población	19
4.1.2 Muestra.....	20
4.1.3 Tipo de estudio	20

4.1.4 Lugar de ejecución.....	20
4.1.5 Equipos e instrumentos.....	20
4.1.6 Insumos y reactivos	20
4.2 Métodos.....	21
4.2.1 Selección de los participantes	21
4.2.2 Recolección de información de los participantes	22
4.2.3 Toma de muestras y extracción de ADN	22
4.2.4 Análisis molecular	22
4.2.5 Visualización de amplificadores	23
4.2.6 Análisis de los geles.....	25
4.2.7 Creación de una base de datos.....	26
4.2.8 Análisis estadístico.....	26
4.2.9 Comunicación de datos obtenidos	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Resultados de amplificación	28
5.2 Frecuencias génicas y genotípicas	30
5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg	32
5.4 Distancias genéticas	35
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES.....	40
8. RECOMENDACIONES	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
10. ANEXOS	51
10.1 Ubicación geográfica de las 4 poblaciones en estudio	51
10.2 Secuencia nucleotídica (FASTA) del Intrón 16 del gen <i>ECA</i>	52
10.3 Registro del polimorfismo I/D de <i>ECA</i> en NCBI.....	52
10.4 Genotipos del polimorfismo I/D de las poblaciones muestreadas.....	53
Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Lima.....	53
Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Monsefú.....	53
Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Moche.....	54
Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Huacho	54
10.5 Árbol de distancias genéticas	55
10.6 Consentimiento informado	56
10.7 Ficha de datos de los participantes	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas fisiológicos regulados por ECA	6
Figura 2. Localización cromosómica del gen <i>ECA</i>	10
Figura 3. Diagrama del gen <i>ECA</i>	11
Figura 4. Secuencia nucleotídica de la región del polimorfismo I/D de <i>ECA</i>	12
Figura 5. Corrida electroforética	24
Figura 6. Determinación del tamaño de los amplicones	25
Figura 7. Polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i> en la población Lima	28
Figura 8. Polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i> en la población Moche	29
Figura 9. Polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i> en la población Monsefú	29
Figura 10. Polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i> en la población Huacho	30
Figura 11. Gráfico comparativo de las frecuencias genotípicas	31
Figura 12. Gráfico comparativo de frecuencias génicas	32
Figura 13. Árbol de distancias genéticas	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las variables del gen <i>ECA</i>	17
Tabla 2. Preparación de poliacrilamida al 6%	23
Tabla 3. Preparación de Gel de poliacrilamida al 6%	24
Tabla 4. Soluciones empleadas en la tinción con nitrato de plata	25
Tabla 5: Rango de valores F_{st}	26
Tabla 6. Frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo I/D del gen <i>ECA</i>	31
Tabla 7. Prueba <i>Chi cuadrado</i> (X^2) de Pearson entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas	33
Tabla 8. Frecuencias genotípicas de otros estudios poblacionales dentro del continente americano y las 4 poblaciones en estudio	34
Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas entre las 4 poblaciones peruanas en estudio y otros estudios poblacionales del continente americano.....	35
Tabla 10. Matriz de distancias genéticas F_{st} (Índice de Nei).....	35
Tabla 11. Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Lima	53
Tabla 12. Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Monsefú	53
Tabla 13. Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Moche	54
Tabla 14. Genotipos I/D del gen <i>ECA</i> en la población Huacho	54

ABREVIATURAS

AD	Alzheimer disease (enfermedad de Alzheimer)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGT	Angiotensinógeno
Ang I/Ang 1-10	Angiotensina I
Ang II/Ang 1-8	Angiotensina II
APS	Ammonium persulfate (persulfato de amonio)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDKRB2	Bradykinin receptor B2 (receptor B2 de bradiquinina)
BK	Bradykinin (bradiquinina)
BPF	Bradykinin-potentiating factor (Factor potenciador de la bradiquinina)
DCP1	Dipeptidil carboxipeptidasa 1
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>ECA</i>	Gen que codifica la Enzima Convertidora de Angiotensina
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina homóloga
ECoA	Evento coronario agudo
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
HTA	Hipertensión arterial
IC	Insuficiencia cardiaca
I/D	Inserción/delección
msnm	Metros sobre el nivel del mar

NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
PA	Presión arterial
PAGE	Polyacrylamide el electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (fragmentos de restricción de longitud polimórfica)
SINES	Short interspersed nuclear elements (elementos nucleares cortos intercalados)
SRA	Sistema renina angiotensina
SNP	Single nucleotide polymorphisms (polimorfismos de un sólo nucleótido)
TBE	Tris-borato-EDTA
TEMED	Tetrametil-etilen-diamina
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada)
7SL	Signal recognition particle RNA (partícula ARN de reconocimiento de señal)

RESUMEN

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) protagoniza un rol importante en la regulación de la presión arterial en dos sistemas fisiológicos: renina-angiotensina y cinina-calicleína. El gen *ECA* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23), consta de 26 exones y 25 intrones. Un polimorfismo de inserción/delección ubicado en el intrón 16, el cual corresponde a una secuencia *Alu* repetitiva de ~287 pb, da origen a tres genotipos: inserción (II), inserción/delección (I/D) y delección (DD).

Existen estudios que vinculan al alelo D con el aumento de la expresión de la ECA, y como consecuencia de ello se tendría una predisposición genética a sufrir enfermedades; sin embargo, estos estudios también han revelado que la determinación del polimorfismo I/D depende de la población muestreada, ya sea por el grupo étnico o por el lugar geográfico a donde esta población pertenece.

El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia del polimorfismo I/D del gen *ECA* en muestras poblacionales peruanas. Se amplificó un fragmento de ADN perteneciente al intrón 16 de este gen mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se trabajó con poblaciones de Monsefú, Moche, Huacho y Lima, resultando que el genotipo predominante para las tres primeras poblaciones es homocigoto II (84.2%, 66.7% y 56.8% respectivamente), en cambio para la población de Lima el genotipo predominante es el heterocigoto I/D (42.9%). El alelo I es el más frecuente en las 4 poblaciones: Monsefú (92.1%), Moche (80.3%), Huacho (73.0%) y Lima (62.5%). Las cuatro poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy–Weinberg. Los valores de las frecuencias génicas y genotípicas obtenidas son muy semejantes a los reportados en poblaciones latinoamericanas, donde la prevalencia del genotipo DD es muy baja y la frecuencia del alelo I es alta.

Palabras clave: presión arterial, sistema fisiológico, polimorfismo (genético), inserción *Alu*, genotipo, predisposición genética.

ABSTRACT

Angiotensin converting enzyme (ACE) plays an essential role in regulating blood pressure in two physiological systems: renin-angiotensin and kinin-kallikrein. The ACE gene is located on the long arm of the chromosome 17 (17q23), consisting of 26 exons and 25 introns. An insertion/deletion polymorphism located in intron 16, which corresponds to an *Alu* repetitive sequence of ~ 287 bp, gives rise to three genotypes: Insertion (II), insertion / deletion (I/D) and deletion (DD).

There are studies that link the D allele with increased ACE expression, and consequently there might be a genetic predisposition to disease; however, these studies have also revealed that the determination of polymorphism I/D depends on the population sampled, either by ethnicity or the geographical location of this population.

The aim of this study is to determine the frequency of the polymorphism I/D of ACE gene in Peruvian population samples. A DNA fragment belonging to intron 16 of this gene was amplified by the technique of polymerase chain reaction (PCR). We worked with populations of Monsefú, Moche, Huacho and Lima, being the predominant genotype for the first three populations is homozygous II (84.2%, 66.7% and 56.8% respectively), while for the population of Lima the predominant genotype is the heterozygous I/D (42.9%). The I allele is the most common in the 4 populations: Monsefú (92.1%), Moche (80.3%), Huacho (73.0%) and Lima (62.5%). The 4 populations are in Hardy-Weinberg equilibrium. The values of gene and genotype frequencies obtained are very similar to those reported in Latin American populations, where the prevalence of DD genotype is very low and I allele frequency is high.

Keywords: blood pressure, physiological system, polymorphism (genetic), *Alu* insertion, genotype, genetic predisposition.

1. INTRODUCCIÓN

Las inserciones *Alu* son las secuencias nucleotídicas móviles más abundantes del genoma humano (Batzner y Deininger, 2002). Su tamaño es de aproximadamente 300 pb (Dagan et al., 2004). La mayoría son polimórficas, pudiendo tomar diferentes valores de frecuencias en diversas poblaciones humanas (Stoneking et al., 1997). Por lo tanto, pueden usarse como marcadores bialélicos de ADN en investigaciones de evolución humana (Antunez-de-Mayolo et al., 2002). Dependiendo del lugar de la inserción, pueden crear o modificar la función de un gen, o involucrarse en la regulación de la expresión de varios genes, como es el caso del polimorfismo de inserción del gen *ECA* (Grover et al., 2003).

La enzima que es codificada por el gen *ECA* desempeña un papel importante en la regulación de dos sistemas fisiológicos: en el sistema renina-angiotensina (SRA), escinde la angiotensina I (Ang I) para convertirla en angiotensina II (Ang II) (vasoconstrictor) y en el sistema calicreína-cinina, inactiva a la bradiquinina (vasodilatador). Consecuentemente, la proteína ECA está directamente relacionada en la regulación de la presión arterial (Sayed-Tabatabaei et al., 2006; Parenica et al., 2010).

El gen *ECA* presenta un polimorfismo de inserción/delección, el cual corresponde a una secuencia *Alu* de ~287 pb en el intrón 16. Este polimorfismo origina tres genotipos: inserción (II), inserción/delección (I/D) y delección (DD) (Rasyid et al., 2012). Este polimorfismo se ha asociado a una regulación de la actividad de ECA circulante y de tejido. Individuos homocigotos para la delección (DD) presentan niveles más elevados de la enzima ECA que individuos con el genotipo ID o II (Ha, 2014). Además, numerosos estudios han vinculado al polimorfismo I/D de *ECA* con una serie de enfermedades crónicas y con una mayor resistencia al esfuerzo físico, dependiendo del genotipo que presente el individuo (Montgomery et al., 1998; Pilati et al., 2004;

Sayed-Tabatabaei et al., 2006; Gard, 2010; Thorn et al., 2010; Cosenso-Martin et al., 2015).

En la actualidad, para realizar un diagnóstico molecular y una terapia génica posterior a este diagnóstico, es de gran importancia el conocimiento y uso de marcadores moleculares relacionados con polimorfismos genéticos que generen o predispongan a enfermedades. En tal sentido, resulta muy conveniente establecer previamente la prevalencia de estos marcadores en la población en general, a fin de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas que permitan su utilización como criterios válidos de diagnóstico, pronóstico y evolución (estimativa de riesgo) en individuos de poblaciones representativas de nuestro país.

En consecuencia, en este trabajo se ha considerado el análisis de un gen marcador (*ECA*), basándonos en la técnica de la PCR para la detección del polimorfismo I/D presente en este gen. Se busca estimar la variación de las frecuencias génicas y genotípicas en muestras poblacionales peruanas, por ser este un gen candidato trascendental como marcador molecular para la caracterización poblacional, debido a la gran importancia para la salud humana por el rol central que juega en la regulación del SRA, relacionándolo con la susceptibilidad para desarrollar enfermedades.

A pesar de esta relación, existe poca información sobre la prevalencia a nivel poblacional de este polimorfismo; determinar su incidencia en un país como el nuestro, donde el grado de mestizaje es muy alto y el entorno geográfico muy variado, hace que el estudio del comportamiento de este polimorfismo en la población peruana sea de mucha importancia. Estos resultados constituyen un aporte al análisis de la distribución de este polimorfismo en nuestra población.

2. MARCO TEÓRICO

Las secuencias de inserción *Alu* son secuencias cortas de nucleótidos que se intercalan en el genoma (SINES). Presentan polimorfismo bialélico que se definen por la presencia/ausencia de un elemento *Alu* con tres posibles genotipos: Homocigoto para la presencia del elemento *Alu*, homocigoto para la ausencia del elemento *Alu* y heterocigoto con un cromosoma con la presencia del elemento *Alu* y otro cromosoma con la ausencia de éste en una localización cromosómica en particular (Stoneking et al., 1997; Dagan et al., 2004). Son los elementos genéticos móviles más abundantes y exitosos dentro del genoma de los primates en los últimos 65 millones de años (Batzer y Deininger, 2002). Cada secuencia *Alu* es de ~300 pb de longitud, comprenden ~10% del genoma humano encontrándose más de un millón de copias insertadas en él. Se cree que derivan ancestralmente del gen de ARN 7SL, un componente citoplasmático de reconocimiento de señal que interviene en la translocación de proteínas secretadas a través del retículo endoplasmático; y se movilizan a través de una transcripción derivada de la ARN polimerasa III en un proceso denominado retrotransposición (Dagan et al., 2004; Pérez et al., 2007).

La mayor parte de las inserciones *Alu* son relativamente recientes y no han alcanzado la fijación, permaneciendo polimórficas, pudiendo tomar diferentes valores de frecuencias en diversas poblaciones humanas (Stoneking et al., 1997) y así utilizarse como sistema de marcador bialélico de ADN en las investigaciones de la evolución humana (Antunez-de-Mayolo et al., 2002).

Para estudios sobre evolución humana, las repeticiones *Alu* ofrecen varias ventajas sobre otros polimorfismos de ADN nuclear. En primer lugar, se estudian mediante ensayos rápidos, simples, basados en la PCR; segundo, son polimorfismos estables recientemente insertados, que rara vez se someten a eliminación; tercero, la presencia de un elemento *Alu* representa la identidad, ya que la probabilidad de que

diferentes elementos *Alu* se inserten de forma independiente en la misma ubicación cromosómica exacta es despreciable; y cuarto, el estado ancestral de una inserción *Alu* es conocido por ser la ausencia del elemento *Alu* en un locus particular (Pérez et al., 2007).

Las secuencias *Alu* carecen de función génica; sin embargo, algunos hallazgos sugieren que tienen un amplio impacto evolutivo, al conocerse su estado ancestral y ser producidas por un único evento mutacional (Batzer et al., 1996); las inserciones *Alu* sirven como marcadores para los estudios de evolución humana (Batzer y Deininger, 2002) y de estimación del grado de mestizaje en poblaciones (Pérez et al., 2007).

A pesar de carecer de función génica, algunas *Alu* pueden llegar a insertarse en ARNm maduros por medio de un proceso llamado exonización. Se presume que ocurre mediante empalme alternativo (Dagan et al., 2004). Estos empalmes, en su gran mayoría, dan origen a genes defectuosos que causan efectos deletéreos sobre el producto final; un ejemplo de ello es la inserción de un elemento *Alu* en el intrón 18 del gen del factor VIII, que conduce a “saltos” en el exón 19 y resulta en una forma grave de la hemofilia A (Ganguly et al., 2003). A veces pueden crear una nueva función o modificar una ya existente, también están involucradas en la regulación de la expresión de diversos genes (Dagan et al., 2004), como es el caso del polimorfismo de inserción en el intrón 16 del gen *ECA*. Curiosamente, las secuencias *Alu* se encuentran agrupadas en genes que están involucrados en el metabolismo, transporte y procesos de señalización; mientras que, son menos abundantes en genes que codifican proteínas estructurales. Esta distribución no aleatoria apoyaría la hipótesis de que *Alu* no sería ADN sin función (ADN basura) (Grover et al., 2003).

2.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA (EC 3.4.15.1) es una metalopeptidasa de zinc que funciona como una dipeptidil carboxipeptidasa 1 (DCP1), la cual escinde el dipéptido C-terminal His-Leu del decapeptido, angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tir-Iso-His-Prol-Fen-His-Leu); formando el octapéptido vasoactivo angiotensina II (Sayed-Tabatabaei et al., 2006). ECA también inactiva a la bradiquinina (BK) mediante la escisión del dipéptido C-terminal Phe-Arg, por lo que es también llamada quininasa II (Crisan y Carr, 2000).

Para el año 1956, ya era conocido que debía de existir una enzima en el plasma que convirtiera la Ang I (conocida en esa época como hipertensina I) en Ang II (llamada hipertensina II), siendo ésta última un verdadero vasoconstrictor. Ese mismo año el doctor Leonard Skeggs, en experimentos con riñones perfundidos de rata, comprobó la existencia de esta enzima. En su reporte, concluye que la enzima convertidora debe de estar presente en el plasma animal en exceso con el fin de que la conversión pueda proceder a una velocidad al menos igual a la tasa de destrucción o utilización de la hipertensina II (Ang II) (Skeggs et al., 1956).

2.1.1 Función fisiológica de la ECA

En la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (ECV), principalmente en la insuficiencia cardiaca (IC) e hipertensión arterial (HTA), así como en las vasculopatías, el SRA tiene participación clave en la remodelación ventricular del infartado y del hipertenso, así como en la remodelación vascular. Es así que las acciones principales del SRA incluyen la regulación de la presión arterial (PA), el tono vascular y la volemia.

El SRA es el resultado de una secuencia de transformaciones de distintas proteínas que obtienen formación de efectores biológicos, hasta ahora en gran parte conocidos. Comienza por la acción de una enzima, la renina, que actúa sobre un sustrato, el

angiotensinógeno (AGT), transformándolo en Ang I. Este decapeptido inactivo, Ang I o Ang 1-10, es transformado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el octapéptido activo, Ang II o Ang 1-8, el cual es un potente vasoconstrictor (Figura 1a) (Thorn et al., 2010).

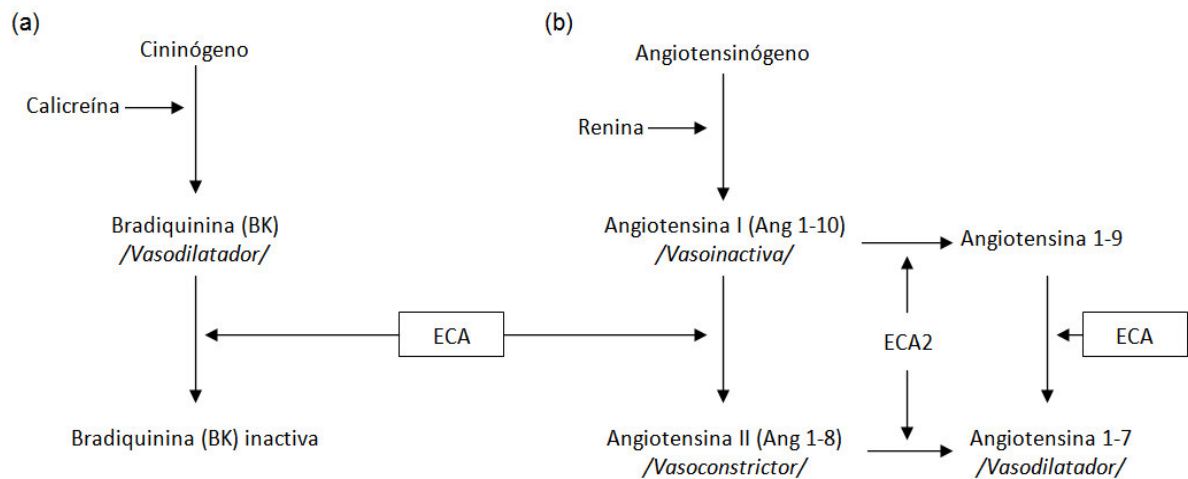


Figura 1. SISTEMAS FISIOLÓGICOS REGULADOS POR ECA. (a) Sistema Cinina-Caliceína. (b) Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

La ECA además de producir el activo principal del SRA; también juega un papel importante en el sistema cinina-caliceína (Figura 1b). La actividad de este sistema produce bradiquinina, la cual causa vasodilatación por medio de la secreción de prostaciclina, óxido nítrico y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio; en el ser humano, ésta es metabolizada por la enzima ECA dejándola inactiva (Parenica et al., 2010), evitando la estimulación de su receptor (BDKRB2) y la posterior liberación de óxido nítrico, que relaja el músculo liso vascular y reduce la presión arterial (Thorn et al., 2010).

Es así que la ECA protagoniza un papel importante dentro de las funciones de regulación de la presión arterial en dos sistemas fisiológicos (Figura 1). Además, ECA también ha demostrado que tiene una variedad de otros sustratos e interacciones

interesantes, incluyendo la proteína precursora de amiloide, un componente principal de las placas en la enfermedad de Alzheimer (AD) (Thorn et al., 2010).

2.1.2 Isoformas de la ECA

El empalme alternativo de los 26 exones que conforman el gen *ECA* da lugar a dos isoformas. La isoforma predominante contiene a los exones 1-26 excepto el 13, que se traduce en una proteína de 1306 aa (149.715 Da) con dos sitios catalíticos independientes de unión a zinc, cada sitio catalítico es activo frente a la Ang I, generando Ang II. Éstos varían en un número de parámetros bioquímicos, incluso en la capacidad para hidrolizar sustratos peptídicos que no sean Ang I (Esther et al., 1997). A esta isoforma se la conoce como ECA somática, se encuentra en varios tejidos endoteliales como en el riñón, hígado e intestino, células epiteliales y algunos tipos de células neuroepiteliales. La segunda isoforma corresponde a la traducción de los exones 13-26 que resulta en una ECA testicular o germinal que sólo contiene un sitio catalítico C-terminal (Thorn et al., 2010). Se transcribe en las células germinales post-meióticas, utilizando un único promotor específico de testículo situado dentro del intrón 12 del gen *ECA* somático y es aproximadamente la mitad del tamaño de la ECA somática (Esther et al., 1997).

La ECA existe principalmente como una glicoproteína tipo I de membrana integral, aunque una forma soluble o plasmática está presente en condiciones normales en el plasma sanguíneo y otros fluidos corporales; la cuál, se desprende de la superficie celular por una escisión proteolítica en la región del tallo yuxtamembrana. La secretasa responsable de la escisión y secreción de ECA es una metaloproteinasa de zinc situada en la superficie celular. ECA es solo una de las proteínas que son desprendidas de la membrana post-traduccionalmente a través de la acción de secretasas (Alfalah et al., 2001).

Cuando hay disfunción endotelial se produce perturbación en la regulación vasomotora, en el crecimiento celular, en el estado inflamatorio de la pared vascular, en la activación de la ECA somática, y aumento de la producción local de Ang II y degradación de BK, todos estos factores perturban la homeostasis circulatoria. Sin embargo, los inhibidores de la ECA tienen la capacidad de revertir en buena parte estas alteraciones (De la Serna y Peral de Bruno, 2010).

2.1.3 Inhibidores de la ECA

El farmacólogo Sergio H. Ferreira en el año 1966 reportó que un componente del veneno de la *Bothrops jararacao*, víbora lanceolada, llamado factor potenciador de la bradiquinina (*BPF*) tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibe la ECA. Debido a que el *BPF* es muy inestable en el organismo y además, por ser un péptido no podía ser administrado por vía oral, es así que se inició la búsqueda de inhibidores más potentes y estables de la enzima.

El primer inhibidor no péptido fue SQ14225 que más tarde se conoció como captopril, y en 1981 fue la primera sustancia que se empleó como inhibidor de ECA en un tratamiento administrado por vía oral para inhibir la conversión de Ang I en Ang II tal como debería suceder si ECA se inhibe en el cuerpo (Smith y Vane 2003). Dos años más tarde siguió la comercialización de un segundo inhibidor ECA denominado enalapril. Con el fin de minimizar los efectos adversos y aprovechar el éxito terapéutico y económico de los fármacos captopril y enalapril se desarrolló una segunda generación de inhibidores ECA, de adquisición en el mercado desde principios de los años 1990, tales como el lisinopril y ramipril.

Inhibidores de la ECA bloquean la formación de angiotensina II, esta enzima tiene una variedad de funciones, entre ellas está la vasoconstricción y la estimulación de la liberación de aldosterona, que a su vez provoca la reabsorción de sodio y agua de la

orina y aumenta la presión arterial. Es por ello que estos inhibidores se utilizan en terapias farmacológicas de primera línea en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardíaca. Respuestas adversas a inhibidores de la ECA incluyen efectos secundarios leves, como tos y otros de mayor grado como angioedemas. Estas respuestas adversas a medicamentos se producen en diferentes frecuencias, en varios grupos raciales y étnicos, con un aumento del riesgo para la tos en asiáticos y mujeres en general, y un mayor riesgo de angioedema en personas de raza negra (Thorn et al., 2010). Inhibición de la ECA también se asocia con defectos congénitos, anomalías particularmente cardiovasculares y renales, y los inhibidores de la ECA están contraindicados para las mujeres que están o pueden quedar embarazadas (Lennestål et al., 2009).

Resultados contradictorios asocian al genotipo DD del polimorfismo I/D del gen *ECA* con una mayor respuesta a inhibidores de la ECA (Sasaki et al., 1996; Stavroulakis et al., 2000) y otros autores asocian una mejor respuesta para genotipos II (Ohmichi et al., 1997; Kohno et al., 1999; Thorn et al., 2010). Sin embargo, existen trabajos que sugieren que tanto el género del individuo como su linaje evolutivo son factores influyentes además del genotipo I/D de *ECA* (Thorn et al., 2010; Zhou et al., 2012).

2.2 El gen *ECA*

En los humanos, el gen *ECA* (también conocido como *DCP1*), se traduce en la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Este gen se ubica en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23) (Figura 2) y consta de aproximadamente 21 kilobases (kb) de longitud, 26 exones y 25 intrones (Hubert et al., 1991; Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

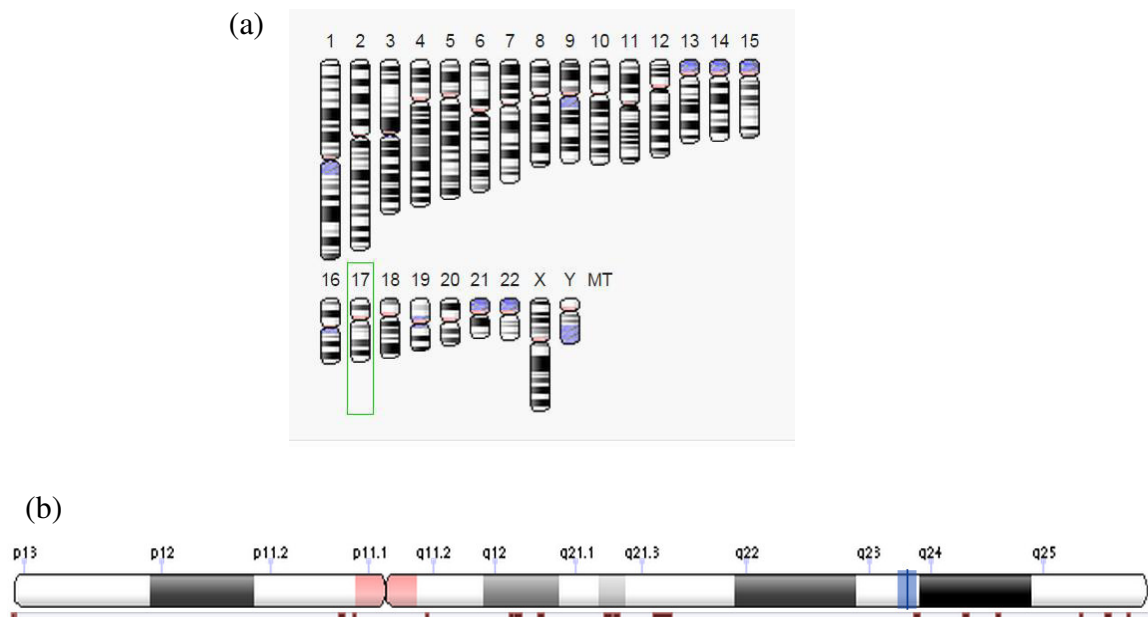


Figura 2. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL GEN *ECA* (a) Idiograma de cromosomas humanos, se señala el cromosoma 17. (b) Ubicación del gen *ECA* en el brazo largo del cromosoma 17 (región 17q23) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?chr=17&from=61565892&to=61565893>s=rs4340&mk=61565892:61565893|rs4340>)

2.2.1 Polimorfismos existentes en el gen *ECA*

En los registros del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos de Norteamérica (NCBI), se enumeran más de 160 polimorfismos del gen *ECA*, la mayoría de los cuales son polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés). Sólo 34 de los polimorfismos se localizan en regiones codificantes y 18 de ellos son mutaciones de sentido erróneo (Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

Uno de los primeros estudios sobre la distribución de ECA plasmática en individuos sanos (Alhenc-Gelas.,1991) sugirió que los niveles de ECA plasmáticos debían estar determinados por factores genéticos, y no por algún factor de tipo hormonal o ambiental, debido a que se encontraron grandes diferencias interindividuales cuando se hicieron las mediciones de los niveles plasmáticos de ECA.

Un año antes, Rigat et al., 1990 reportaron por primera vez, un polimorfismo que consiste en la presencia o ausencia de un fragmento de ADN de 250pb en el gen *ECA*

usando ADNc de ECA endotelial. Este polimorfismo fue usado como marcador en individuos sanos para medir sus niveles de ECA en suero. Se reportó una diferencia significativa entre los individuos homocigotos para la ausencia de este fragmento respecto a los homocigotos para la inserción del mismo.

El polimorfismo I/D del gen *ECA* se encuentra en una región no codificante (Intrón 16) lo que lo hacía poco probable para ser una variante funcional; es así que posteriormente se estudiaron asociaciones entre otras variantes en el gen y a nivel de plasma, para encontrar polimorfismos funcionales (Figura 3).

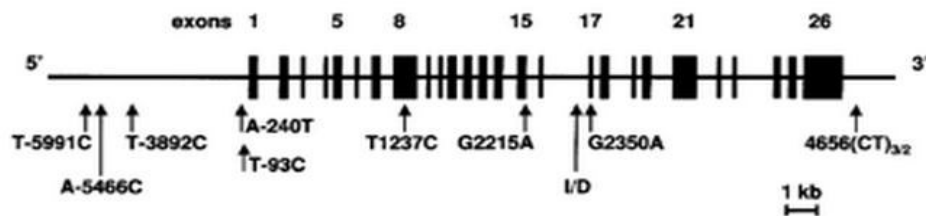


Figura 3. DIAGRAMA DEL GEN *ECA*. Se observa la ubicación de 10 polimorfismos bialélicos analizados por Keavney et al., 1998.

Otros polimorfismos de nucleótido único del gen *ECA* se han asociado de forma significativa con la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo rs1800764, rs4267385 y rs4291. Variantes rs4290 y rs7213516 en el promotor de *ECA* han demostrado que reducen la transcripción de la enzima y se han asociado con resultados cardiovasculares adversos (Thorn et al., 2010).

A pesar de las diversas investigaciones de otros polimorfismos la variante más conocida en el gen *ECA* es la inserción/delección (I/D) en el intrón 16. Se sugirió que el polimorfismo I/D tiene un desequilibrio de ligamiento a una región que controla la expresión de la ECA, debido a una fuerte asociación entre este polimorfismo y la actividad de esta enzima en sangre y tejidos (Daugherty et al., 2010).

2.2.1.1 Polimorfismo I/D en el gen *ECA*

El polimorfismo I/D es el más estudiado del gen *ECA*, fue detectado inicialmente por hibridación *Southern Blot* usando ADNc completo de *ECA* endotelial humano como sonda, que previamente fue digerido por enzimas de restricción bajo la técnica de detección de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*). Posteriormente, el fragmento que contenía al polimorfismo fue usado como sonda. A la inserción/alelo largo se le asignó la letra I y a la delección/alelo corto la letra D (Rigat et al., 1990).

La secuencia de inserción y de las regiones flanqueantes fueron determinadas por el método de cadena de terminación (secuenciación de Sanger) en un fragmento genómico clonado de *ECA* (Hubert et al., 1991); gracias a este reporte, Rigat et al., 1992 realizaron la primera detección del polimorfismo I/D de *ECA* mediante *PCR*. Para ello, utilizaron un par de cebadores (*primers*) que se unen a las regiones flanqueantes de la secuencia de inserción (Figura 4 (a) y (b)).

La inserción está localizada en el intrón 16 del gen *ECA* (Anexos 10.2 y 10.3). Es una secuencia *Alu* repetitiva de ~287 pb (Figura 4(a)). Presenta un patrón de herencia codominante, origina tres genotipos: Inserción (II), Inserción/Delección (I/D) y Delección (DD) (Rasyid et al., 2012). Generalmente se describe al polimorfismo I/D de *ECA* mediante rs1799752 (Anexo 10.3), aunque también a veces se representa como rs4340, rs13447447 y rs4646994 (Gard, 2010).

(a) Secuencia nucleotídica - alelo D

```
CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCTCCCATTTCTCTAGACCTGCTGCCTATACAGTC  
ACTTTTATGTGGTTTCGCCAATTTTATTCCAGCTCTGAAATTCTCTGAGCTCCCCTT  
ACAAGCAGAGGTGAGCTAAGGGCTGGAGCTCAAGGCATTCAAACCCCTACCAGAA  
TCTGACGAATGTGATGGCCACGTC
```

(b) Secuencia nucleotídica - alelo I

CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCTCCCATTTCTCTAGACCTGCTGCCTATACAGTC
ACTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAG
TGGCGGGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCACGCCATTCTCC
TGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACCACAGGCGCCCGCCACTACGCCCGGCT
AATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCGTTTTAGCCGGGATGGTCTC
GATCTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACA
GGCGTGATACAGTCACTTTTATGTGGTTTCGCCAATTTTATTCCAGCTCTGAAATT
CTCTGAGCTCCCCTTACAAGCAGAGGTGAGCTAAGGGCTGGAGCTCAAGGCATT
CAAACCCCTACCAGATCTGACGAATGTGATGGCCACGTC

Figura 4. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓN DEL POLIMORFISMO I/D DE *ECA*.
(a) Secuencia del gen *ECA* sin la inserción *Alu*. (b) Secuencia del gen *ECA* con la inserción *Alu* ~287pb (NCBI ref: X62855.1 (Anexo 10.2), SNP: rs1799752 (Anexo 10.3)). (N): Secuencia de inserción. (N): Primers. (Koyama et al., 2008)

La inserción parece reducir la expresión de la ECA, por lo tanto los homocigotos DD tienen un 65% más de expresión de la proteína, y los heterocigotos ID un 31% más de expresión de la enzima en relación a los homocigotos II (Gard, 2010). En comparación con el genoma del chimpancé, el cual no presenta la inserción *Alu* en ese lugar del gen *ECA*, se sugiere que el alelo D es el alelo ancestral (Thorn et al., 2010) y al alelo I se lo asocia a un estado protector de la actividad enzimática de ECA en caso de homocigosis (II) por reducir la actividad de ésta casi a la mitad (Daugherty et al., 2010).

Las diferencias en las frecuencias de los alelos se han observado en los diferentes grupos étnicos/raciales. Por ejemplo, se ha reportado que el alelo D es menos frecuente en los asiáticos (Thorn et al., 2010) y más frecuente en poblaciones árabes (Gard, 2010). Aunque no está 100% comprobado que entre estas poblaciones, la producción de Ang II varíe, sí se podría esperar una mayor predisposición a ciertos fenotipos relacionados a cada alelo y resistencia a la terapia farmacológica con inhibidores de ECA en el caso de poblaciones con predominancia del alelo D.

2.2.1.1.1 Polimorfismo I/D y enfermedades asociadas

Desde el primer reporte en el año 1990, el polimorfismo I/D ha sido asociado con una gran variedad de fenotipos en más de 800 artículos publicados, muchos de ellos con resultados contradictorios. De acuerdo con la fuerte relación entre el polimorfismo I/D y la actividad de ECA, sería lógico pensar que el tipo de genotipo puede influir en el riesgo de presentar determinada condición fisiológica o enfermedad. Siendo este el caso, el genotipo DD al ser responsable de una mayor actividad enzimática podría estar relacionado con trastornos circulatorios (Casanueva Calero y Ferreira Capote, 2011); existen reportes que asocian al alelo D con un mayor riesgo de hipertensión, de infarto al miocardio, cardiomiopatía, hipertrofia ventricular izquierda (Kohno et al., 1999; Cosenso-Martin et al., 2015) y enfermedad de la arteria coronaria: ECV (Danser et al 1995; Pilati et al., 2004; Gard, 2010). Por otro lado, el alelo D parece ofrecer protección contra la esquizofrenia y confiere mejor estado físico en la vejez (Gard, 2010). El alelo I, por su parte ofrece un mejor rendimiento/resistencia física (Montgomery et al., 1998), pero con un mayor riesgo de AD (Kehoe y Wilcock, 2007; Thorn et al., 2010) y apnea obstructiva del sueño en los hipertensos (Gard, 2010).

Otras enfermedades y condiciones para las cuales se ha evaluado la asociación con el polimorfismo I/D de la ECA son: nefropatía diabética (Ha, 2014), aterosclerosis (Daugherty et al., 2010), accidente cerebrovascular isquémico (Zhang et al., 2012), rinitis alérgica (Lin et al., 2014), longevidad (Sayed-Tabatabaei et al., 2006), insuficiencia renal, enfermedad de Parkinson, asma bronquial, diabetes mellitus tipo 2, hábito de fumar y respuesta al tratamiento con medicamentos como inhibidores de la ECA y diuréticos tiazídicos (Castellon y Hamdi 2007; Chung C-M et al., 2013).

A pesar de todos los estudios relacionados con el polimorfismo (I/D) de ECA y los estudios sobre su intervención fisiológica en los seres humanos, la relación entre la variación genética de ECA, las concentraciones plasmáticas de la ECA, y la actividad de la ECA aún no es del todo clara. Incluso algunos autores consideran concluyentes

los resultados obtenidos en relación a la nefropatía diabética y AD; sin embargo, los informes sobre la mayoría de fenotipos en particular los relacionados a enfermedades cardiovasculares aún son contradictorios y controversiales.

2.2.1.1.2 Estudios del polimorfismo I/D del gen *ECA* en poblaciones peruanas.

En el año 2002, ante la evidencia de que la expresión de componentes del SRA están implicados en la presencia de enfermedad coronaria y en la aparición de un evento coronario agudo (ECoA), se analizó el genotipo DD del polimorfismo I/D del gen *ECA* y el genotipo TT del polimorfismo M235T del gen angiotensinógeno (*AGT*) como factor de riesgo para la aparición de ECoA. Concluyeron que el genotipo DD es factor de riesgo para ECoA en la población estudiada (Lizaraso S. et al., 2002a).

Los mismo autores, a finales del mismo año, publican otro estudio en el que analizan la relación entre pacientes hipertensos primarios (HTA) y el genotipo DD del polimorfismo I/D del gen *ECA* y el genotipo TT del polimorfismo M235T del gen *AGT*; donde tienen como meta el diseño de estrategias de prevención y cura de HTA. Concluyen que ninguno de los dos polimorfismo, ni los niveles de ECA plasmático serían factores de riesgo importantes de HTA en la población analizada (Lizaraso S. et al., 2002b).

Posteriormente en el año 2003, se estudió la relación de 5 loci polimórficos en genes componentes de SRA, entre ellos el polimorfismo I/D de *ECA*, en una población Quechua de Ollantaytambo-Cusco, Perú, población ubicada a gran altura (entre 3000 y 4500 msnm) y en una población Amerindia Maya de la península de Yucatán, México, población a baja altura (<500 msnm). En este estudio no se detectaron diferencias significativas entre las dos poblaciones (Rupert et al., 2003).

Descailleaux et al. (2008), reportaron un estudio con individuos de 6 poblaciones peruanas: 2 de la región andina, 2 de la región amazónica y 2 de Lima metropolitana.

En las poblaciones de Lima metropolitana trabajaron con individuos aparentemente sanos y con pacientes diabéticos, concluyendo que el genotipo ID es el más frecuente en la población mórbida y el II en la población normal, recomendando se considere estos resultados como una posible tendencia que debe ser clarificada con estudios más amplios. Finalmente, concluyeron que el alelo de inserción (I) fue el más frecuente en las 6 poblaciones y que este alelo presenta una gradiente de frecuencia poblacional en la dirección: selva, andes, Lima.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la frecuencia del polimorfismo I/D del gen *ECA* en 4 muestras de la población peruana.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar las frecuencias génicas y genotípicas de la variable I/D del gen *ECA* para cada muestra estudiada.
- Determinar la valoración de homocigosis y heterocigosis de los alelos I/D del gen *ECA* en muestras poblacionales peruanas y determinar si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Comparar los resultados obtenidos en las 4 poblaciones estudiadas con los reportados en otras poblaciones.
- Estimar las distancias genéticas entre las 4 poblaciones de estudio.

3.3 Variables

Tabla 1. Clasificación de las variables del gen *ECA*

Variable	Tipo	Genotipo	Escala de medición
Alelo I Alelo D	Cualitativa nominal y dicotómica	II	Banda de 480 pb
		ID	Bandas de 480 y 191 pb
		DD	Banda de 191 pb

3.3.1 Definición de las variables

Alelo I: Consiste en la inserción de una secuencia repetitiva *Alu* de ~287 pb en el Intrón 16 del gen *ECA*, este alelo se relaciona con niveles normales de la enzima ECA en plasma y con una mayor resistencia física. Se ha notificado que los portadores de este alelo tienen un mayor consumo de oxígeno, y una mayor respuesta a la formación y al aumento de la eficiencia muscular, en comparación con los individuos portadores del alelo D.

Alelo D: Se refiere a la ausencia de una secuencia de ADN de ~287 pb en el Intrón 16 del gen *ECA*. Varios estudios sugieren que este alelo confiere un mayor riesgo para las enfermedades cardiovasculares.

La combinación de estas variables resulta en tres genotipos: II, ID y DD. Las personas con genotipo II presentan el alelo I del gen *ECA* en ambos cromosomas 17 (17q23); este genotipo se evidencia con una banda de 480 pb correspondiente a la superposición de ambos fragmentos generados en la amplificación. Asimismo, las personas con genotipo ID presentan un alelo I y un alelo D del gen *ECA*, cada uno ubicado en uno de los cromosomas 17 (17q23), evidenciándose con una banda de 480 pb la cual corresponde al alelo I y otra banda de 191 pb correspondiente al alelo D. Por último, las personas con genotipo DD presentan el alelo D del gen *ECA* en ambos cromosomas 17 (17q23), la cual se evidencia con una banda de 191 pb correspondiente a la superposición de ambos fragmentos generados en la amplificación; este genotipo genera que el nivel en plasma de la ECA esté elevado en sujetos homocigotos para el alelo de delección (DD) en comparación con los heterocigotos (ID) o los sujetos homocigotos para el alelo de inserción (II).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Población

La población evaluada corresponde a individuos peruanos de las ciudades de: Huacho y Lima (dpto. de Lima), Moche (dpto. de La Libertad) y Monsefú (dpto. de Lambayeque) (Ver distribución geográfica en anexo 10.1).

Huacho, es una ciudad en la costa central del Perú, capital de la provincia de Huaura la cual forma parte del departamento de Lima. Esta ciudad se ubica en una bahía formada por el Océano Pacífico a 150 km al norte de la ciudad de Lima. Consta de 55,442 habitantes (INEI 2007).

Lima Metropolitana, es el área metropolitana conformada por la gran conurbación centrada en la ciudad de Lima, la cual abarca gran parte de las provincias de Lima y Callao. El área metropolitana de Lima, consta de 49 distritos, que son parte integrante de la Provincia de Lima (43 distritos) sumada a la Provincia Constitucional del Callao (6 distritos), conformada por una población aproximada de 8 millones de habitantes (INEI 2007).

Moche, es uno de los 11 distritos de la provincia de Trujillo, ubicada en el departamento de La Libertad. Se encuentra a 10 msnm y consta de 29,727 habitantes (INEI 2007).

Monsefú, es capital del distrito de Monsefú, que conforma la Provincia de Chiclayo, ubicada en el Departamento de Lambayeque. Está situada a 15 km al sur este de la ciudad de Chiclayo, a 11 msnm y tiene una población aproximada de 30,000 habitantes (INEI 2007).

4.1.2 Muestra

El tipo de muestra es no probabilística; es decir, la elección de los elementos muestrales no dependerá de la probabilidad, sino de las características de cada individuo que se necesitan para cumplir el objetivo trazado en la presente investigación (véase 4.2.1).

4.1.3 Tipo de estudio

Estudio de tipo exploratorio de diseño no experimental, transversal y descriptivo. Según el estudio de la variable es tipo de investigación cualitativa nominal y dicotómica.

4.1.4 Lugar de ejecución

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.1.5 Equipos e instrumentos

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO serie: DO54056).
- Micropipetas 10 µl, 200 µl y 1000 µl (Axygpet).
- Termociclador de PCR convencional (Eppendorf AG22331).
- Agitador magnético (MAGmix 65906).
- Balanza analítica digital de dos decimales. Máx. 300 g (Dakota mod.:3102).
- Cámara electroforética (CleaverScientific VS10S1).
- Fuente de poder (CleaverScientific MP-300N).

4.1.6 Insumos y reactivos

- Equipo estéril para cada procedimiento: mandil, guantes sin talco (Nitrilicare), mascarilla (HMK), gorros (Family doctor).
- Materiales de vidrio (vasos de precipitados, pipetas, probetas) (Pyrex).

- Microtubos 0,2 µl y 1,5 µl (Eppendorf).
- Tips 10 µl, 200 µl y 1000 µl (Axigen).
- Kit de extracción de ADN (High Pure PCR Template Preparation de Roche).
- Amplificación por PCR convencional: Kits *MaximoTaq DNA polymerase* y dNTP's (GeneOn). Agua destilada estéril libre de RNAasas de grado molecular. Cebadores o *primers*.
- Electroforesis: acrilamida (Promega), bisacrilamida (Promega), buffer TBE 10X pH 8,2, tris base (Roche), ác. bórico (Merck), EDTA 0,5 M pH 8,0 (Calbiochem), buffer de siembra o dye (Fermentas), persulfato de amonio (Promega), marcador de 100 pb. (Fermentas).

4.2 Métodos

4.2.1 Selección de los participantes

Criterios de inclusión:

- Individuos con plena capacidad de ejercicio (según código civil peruano art. 42).
- Mayores de 18 años.
- Individuos aparentemente saludables y no emparentados entre sí con otros participantes.
- Tanto los participantes en este estudio como sus progenitores deben ser nacidos de la ciudad donde se realiza la toma de muestra.

Criterios de exclusión:

- Individuos con algún impedimento mental para poder tomar decisiones.
- Menores de 18 años.
- Individuos que padecen alguna enfermedad.
- Individuo que mantenga parentesco sanguíneo con un participante.

- Persona que no haya nacido en la ciudad donde se realiza la toma de muestra o que uno o ambos progenitores tampoco lo sean.

Los participantes son voluntarios adultos de ambos sexos, para lo cual se les explicó acerca de los objetivos y procedimientos de la presente investigación. Ellos expresaron por escrito su voluntad de participar a través de la aceptación del consentimiento informado (Anexo 10.6).

La selección de los participantes comprendió dos etapas, un primer grupo en el año 2013 como parte de un proyecto preliminar y el segundo grupo en el año 2014; ambos grupos constituyen la población total con la que se llevó a cabo esta investigación.

4.2.2 Recolección de información de los participantes

Una vez consentida su participación se les solicitó llenar una ficha de datos (Anexo 10.7) la cuál se mantiene archivada bajo estricta confidencialidad, asignándole una codificación a cada voluntario para el análisis muestral.

4.2.3 Toma de muestras y extracción de ADN

A cada participante voluntario se le tomó una muestra de sangre periférica (5-8 ml) en condiciones de asepsia, para lo cual se utilizó una jeringa hipodérmica tipo descartable, y tubos vacutainer estériles, con el anticoagulante EDTA.

La extracción de ADN se realizó con el *kit High Pure PCR Template Preparation* de Roche y se siguió las especificaciones de la Versión 18 - catálogo No. 11 796 828 001.

4.2.4 Análisis molecular

Se empleó una alícuota de la muestra de ADN la cuál fue llevada a una concentración de 20 ng/μl. Ésta se utilizó para amplificar el segmento de la región del gen *ECA*, que

puede contener la inserción *Alu*, mediante la técnica de PCR convencional, para la cual se utilizó oligonucleótidos específicos (*primers*), según *Rigat et al., 1992*.

Se utilizó 10 pmol de cada *primer*: sentido 5´ CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3´ y anti-sentido 5´ GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT 3´ en un volumen final de 25 µl que contiene: 3 mM de MgCl₂, Buffer de la enzima a 1X, 0,5 mM de cada dNTP, 1 unidad de enzima *MaximoTaq DNA polymerase*. El ADN se amplificó en las siguientes condiciones: 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. Finalmente, una última extensión de 5 minutos a 72 °C.

4.2.5 Visualización de los amplificados

Para evidenciar presencia o ausencia (I/D) del polimorfismo de inserción se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6%, los pasos a seguir fueron los siguientes.

Primero, se preparó *stock* de poliacrilamida al 21% (acrilamida y bisacrilamida en relación 20:1 respectivamente). Por separado se preparó buffer TBE 10X pH 8.2 (tris base, ác. bórico y EDTA). Luego, para obtener la solución de trabajo al 6% se mezcló proporcionalmente, poliacrilamida al 21% con TBE 10X pH 8.2 y se enrasó con agua bidestilada hasta el volumen de trabajo final deseado (Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de poliacrilamida al 6% (solución de trabajo)

Poliacrilamida al 21%	14,3 ml
Buffer TBE 10X	5 ml
H ₂ O	Enrasar a 50 ml

Finalmente, para preparar el gel, se vertió en un vaso de precipitado un volumen suficiente de poliacrilamida al 6% para agregarle TEMED y APS, siendo el primero un catalizador para la polimerización de la acrilamida con la bisacrilamida y el segundo el

iniciador y causante de la polimerización (Tabla 3). Esta mezcla fue vertida entre unas lunas, que sirvieron de soporte al gel y al terminar, en la parte superior fueron colocados unos separadores en forma de peine que formaron los pocillos donde se colocaron las muestras.

Tabla 3. Preparación de Gel de poliacrilamida al 6%

Poliacrilamida al 6% (stock de trabajo)	9 ml
TEMED	11 μl
APS	110 μl

Una vez que el gel polimerizó completamente, se colocó en la cámara electroforética vertical para proceder a cargar las muestras (Fig. 5a). Previamente, cierta cantidad de cada amplificado (2,5 μ l) fue mezclado con 1 μ l de buffer de siembra. Una vez que todas las muestras fueron cargadas, el gel estuvo listo para ser conectado a la fuente de poder a 100 V por 60 minutos (Fig. 5b). Por diferencia de cargas, el ADN amplificado migró al polo positivo y la variación de tamaño entre los fragmentos de inserción y de delección permitió observar un patrón específico en la posición de las bandas al momento de revelar el gel (4.2.6).



Figura 5. CORRIDA ELECTROFORÉTICA. (a) Carga de muestras (2,5 μ l de amplicón + 1 μ l de buffer de siembra). (b) Gel listo para la corrida a 100 V durante 60 minutos.

Cumplido el tiempo de corrida, se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata, para ello se necesitaron tres soluciones: la solución de fijación, la solución de impregnación

o de tinción y la solución de revelado (Tabla 4). Finalmente, todos los geles fueron fotografiados para el análisis respectivo (4.2.6).

Tabla 4. Soluciones empleadas en la tinción con nitrato de plata.

Solución	Compuestos y volúmenes	Tiempo
Fijación	<ul style="list-style-type: none"> Etanol Absoluto 10% (13,5 ml) Ác. Acético 0.5% (0,75 ml) Agua Destilada (Enrasar a 150 ml) 	Mínimo 3'
Impregnación/Tinción	<ul style="list-style-type: none"> Nitrato de plata (0,3 g) Agua Destilada (Enrasar a 150 ml) 	1' 30''
Revelado	<ul style="list-style-type: none"> NaOH (3,0 g) Agua Destilada (Enrasar a 150 ml) Formaldehído al 37% (450 µl) 	Hasta observar bandas

4.2.6 Análisis de los geles

Detección del Alelo I: Se espera obtener amplicones de 480 pb.

Detección del Alelo D: Se espera obtener amplicones de 191 pb. (Figura 6)

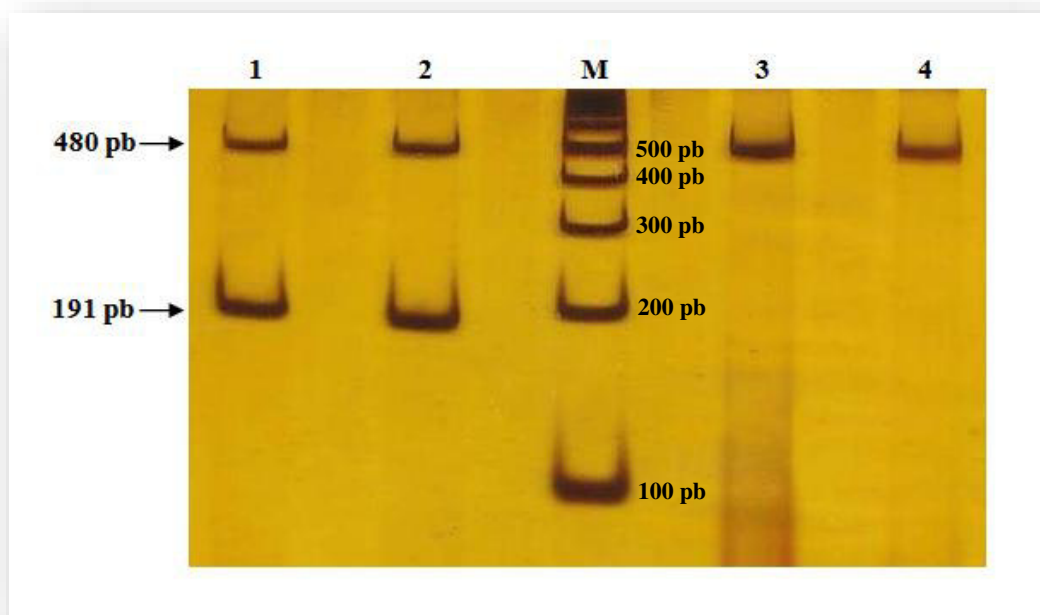


Figura 6. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS AMPLICONES. Gel de poliacrilamida al 6%, coloreado con nitrato de plata. Columnas 1 y 2, heterocigoto I/D (480 pb y 191 pb); columnas 3 y 4, homocigoto II (480 pb). M: marcador de 100 pb.

4.2.7 Creación de una base de datos

La base de datos se construyó en una hoja de excel con la codificación asignada en la recolección, se ordenó la información de cada participante y posteriormente se adicionó la genotipificación obtenida mediante el análisis molecular.

4.2.8 Análisis estadístico

El primer paso fue obtener los genotipos del polimorfismo I/D del gen *ECA* para cada individuo, esta información fue vaciada en el programa GENEPOP versión 4.2.2 para determinar las frecuencias génicas y genotípicas, el valor esperado de homocigosis y heterocigosis se obtuvo usando la corrección de *Levene's* (Tavakoli 2013). Se aplicó el test de Hardy-Weinberg (Roth 2007) y se estimó el *p-value* por el método de cadena de Markov (Sanz 2013).

El segundo paso consistió en procesar la información de las frecuencias genotípicas de cada población en el software PHYLIP 3.695– GENDIST en la opción: distancia genética de Nei (Nei, 1978), a fin de obtener los valores de F_{st} conocidos también como de divergencia evolutiva, diferenciación genética, coeficiente de coancestría o coeficiente de coalescencia. Con ello, se apreció la distribución del polimorfismo I/D de *ECA* entre las poblaciones estudiadas: Matriz de Distancias Genéticas. Los valores obtenidos en la matriz de distancias fueron contrastados con la tabla de calificación de valores F_{st} (Tabla 5):

Tabla 5. Rango de valores F_{st} (Córdova et al., 2011)

F_{st}	Diferenciación genética
0.00 – 0.05	Pequeña
0.05 – 0.15	Moderada
0.15 – 0.25	Alta
>0.25	Muy alta

Si los valores F_{st} están entre 0-1, 0 indica que no existe divergencia genética, mientras que un F_{st} de 1 indica un completo aislamiento de las poblaciones.

Finalmente, se elaboró el árbol de coancestría o de divergencia genética con el método UPGMA versión 3.695 con NEIGHBOR en el mismo paquete de PHYLIP, para expresar gráficamente los valores F_{st} entre pares de poblaciones.

4.2.9 Comunicación de datos obtenidos

Los datos genotípicos obtenidos en esta investigación no serán comunicados a los participantes, debido a que conforman una estadística; mas no un diagnóstico molecular (Anexo 10.6, pág. 56).

5. RESULTADOS

5.1 Resultados de amplificación

Se amplificó la región del gen *ECA* donde se inserta la secuencia *Alu* ~287 pb en un total de 145 individuos correspondientes a las poblaciones de Lima (56), Moche (33), Monsefú (19) y Huacho (37) (Anexo 10.4) mediante la técnica de PCR convencional. La amplificación generó segmentos de 191pb (alelo D) y 480 pb (alelo I).

Mediante PAGE no denaturante al 6% y mediante tinción con nitrato de plata, se visualizó el patrón de bandas para los genotipos II, ID y DD como se puede observar en las figuras 7,8, 9 y 10. En todos los geles se usó marcador de tamaño molecular de 100 pb (M).

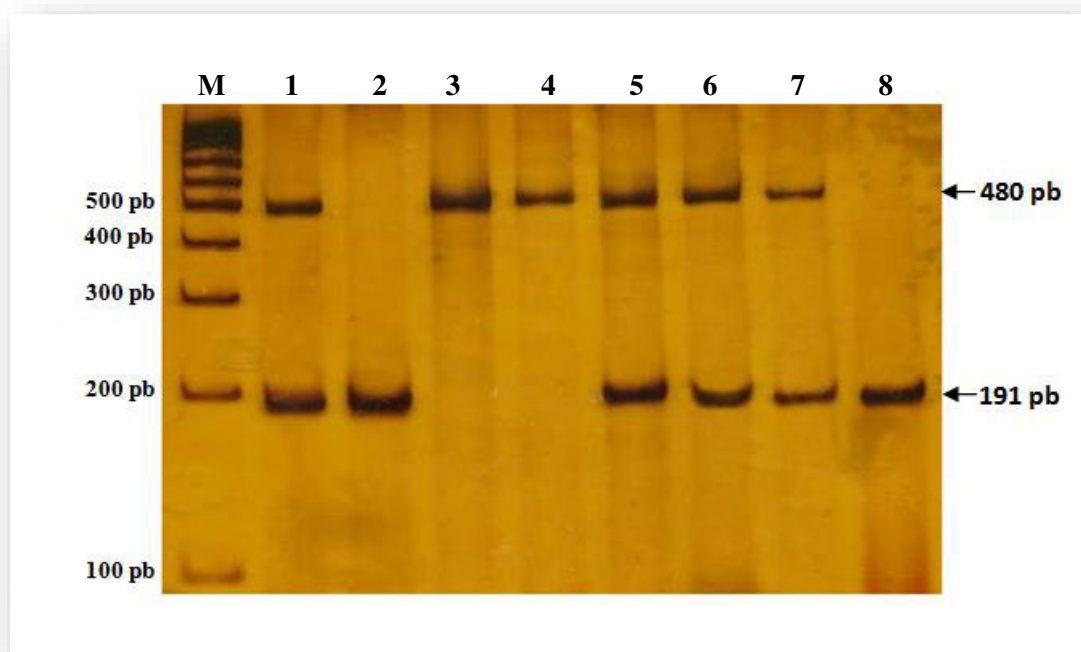


Figura 7. POLIMORFISMO I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN LIMA. Gel de poliacrilamida al 6% y coloreado con nitrato de plata. Columnas 3 y 4 homocigoto con inserción *Alu* (II); columnas 2 y 8 homocigoto sin inserción *Alu* (DD); columnas 1, 5, 6 y 7 heterocigoto (I/D). M: marcador de 100 pb.

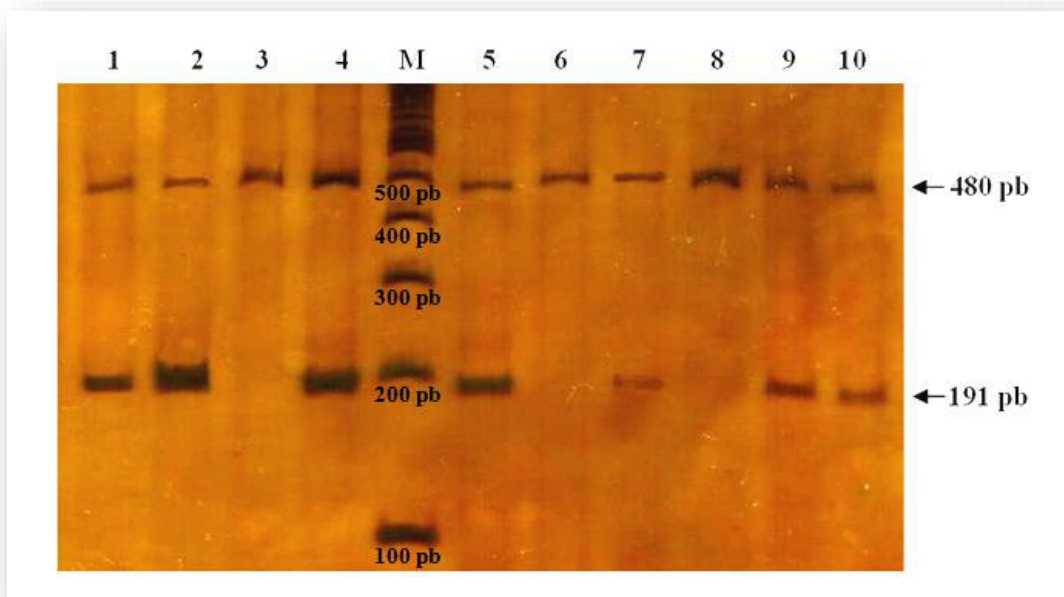


Figura 8. POLIMORFISMO I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN MOCHE. Gel de poliacrilamida al 6% y coloreado con nitrato de plata. Columnas 3, 6 y 8 homocigoto con inserción *Alu* (II); columnas 1, 2, 4, 5, 7, 9 y 10 heterocigoto (I/D). M: marcador de 100 pb.

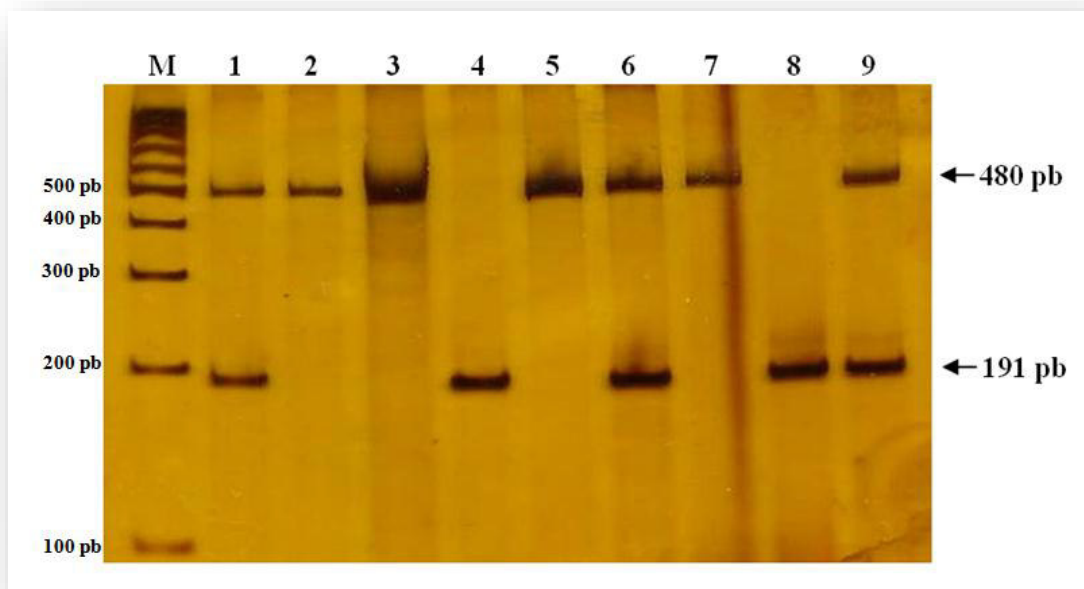


Figura 9. POLIMORFISMO I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN MONSEFÚ. Gel de poliacrilamida al 6% y coloreado con nitrato de plata. Columnas 2, 3, 5 y 7 homocigoto con inserción *Alu* (II); columnas 4 y 8 homocigoto sin inserción *Alu* (DD); columnas 1, 6 y 9 heterocigoto (I/D). M: marcador de 100 pb.

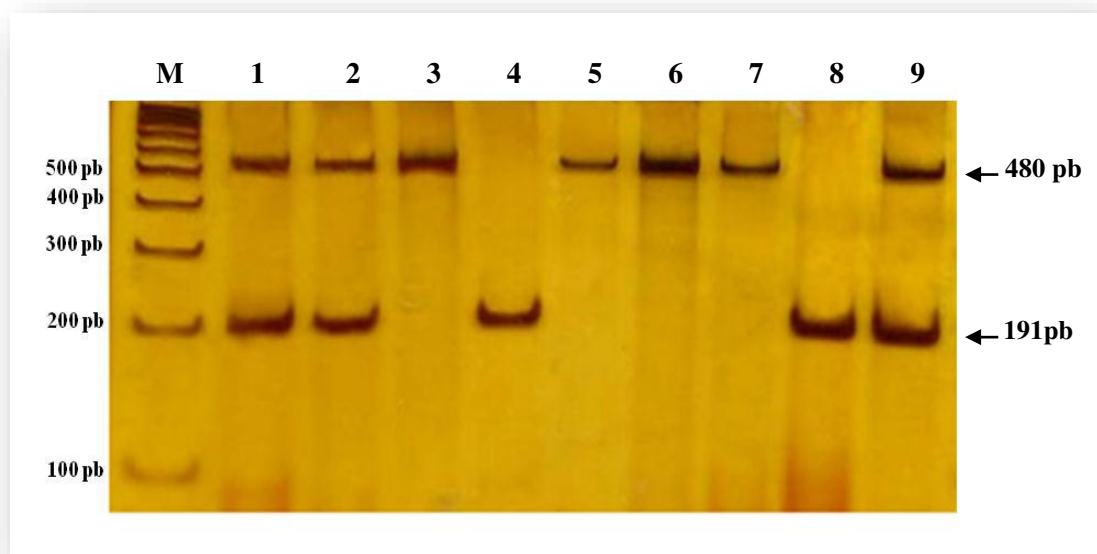


Figura 10. POLIMORFISMO I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN HUACHO. Gel de poliacrilamida al 6% y coloreado con nitrato de plata. Columnas 3, 5, 6 y 7 homocigoto con inserción *A/II* (II); columnas 4 y 8 homocigoto sin inserción *A/II* (DD); columnas 1, 2 y 9 heterocigoto (I/D). M: marcador de 100 pb.

5.2 Frecuencias génicas y genotípicas

Se estimaron las frecuencias génicas y genotípicas para las 4 poblaciones en estudio (Tabla 6). En ella se observa que en la población de Monsefú, el genotipo predominante es II (84.2 %); además, en la población muestreada no se encontró el genotipo DD. En las poblaciones de Moche y Huacho el genotipo predominante también es II (66.7% y 56.8% respectivamente) y en menor frecuencia se encontró al genotipo DD (6.1% y 10.8% respectivamente). Resultados diferentes fueron obtenidos en las frecuencias genotípicas de la población de Lima, donde el genotipo predominante es ID (42.9 %), ligeramente superior a la frecuencia genotípica II (41.1%), y en menor frecuencia, el genotipo DD (16.1%). El alelo I es el más frecuente en las 4 poblaciones, obteniéndose el valor más bajo en la población de Lima (62.5 %) y el valor más alto en la población Monsefú (92.1 %); en contraposición, el alelo D es el menos frecuente, obteniéndose el valor más bajo en la población Monsefú (7.9%) y el valor más alto en la población Lima (37.5 %).

Tabla 6. Frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo I/D del gen *ECA*.

POBLACIÓN	Frecuencias Genotípicas						Frecuencias Génicas			
	II		ID		DD		I		D	
	N	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	
MONSEFÚ	19	16 84.2	3 15.8		0 0		35 92.1	3 7.9		
MOCHE	33	22 66.7	9 27.3		2 6.1		53 80.3	13 19.7		
LIMA	56	23 41.1	24 42.9		9 16.1		70 62.5	42 37.5		
HUACHO	37	21 56.8	12 32.4		4 10.8		54 73.0	20 27.0		
TOTAL	145	82 56.6	48 33.1		15 10.3		212 73.1	78 26.9		

En las poblaciones de Moche, Monsefú y Huacho el genotipo predominante es homocigoto para la inserción (II); a diferencia de la población de Lima, donde el genotipo predominante es ID, este resultado es ligeramente mayor a la frecuencia del genotipo II para dicha población. En las 4 poblaciones estudiadas se obtiene que la frecuencia del genotipo DD es menor, principalmente en las poblaciones del norte (Monsefú y Moche) (Figura 11).

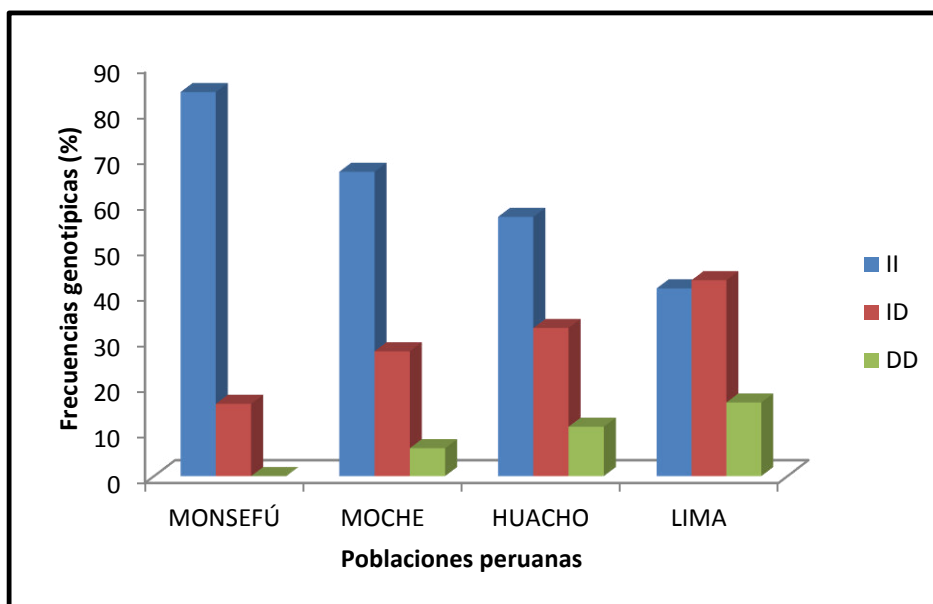


Figura 11. GRÁFICO COMPARATIVO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS. Frecuencias genotípicas del polimorfismo de inserción I/D del gen *ECA*, entre las 4 poblaciones peruanas en estudio.

En la figura 12 se puede observar que la frecuencia del alelo con la inserción (I) es mayor para todas las poblaciones en comparación con la frecuencia del alelo sin la inserción (D). También se observa una gradiente creciente de frecuencia del alelo D desde las poblaciones del norte hacia Lima

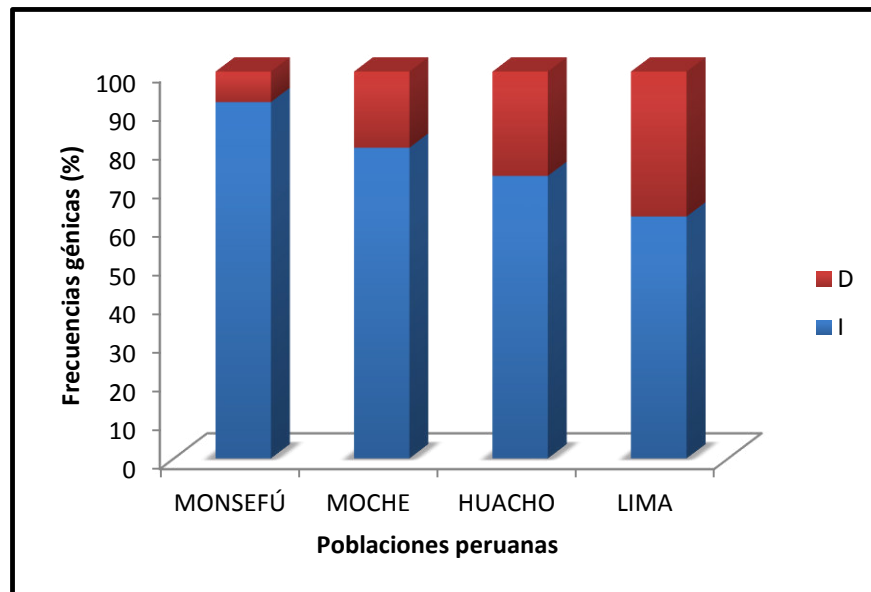


Figura 12. GRÁFICO COMPARATIVO DE FRECUENCIAS GÉNICAS. Frecuencias génicas del polimorfismo de inserción I/D del gen *ECA*, entre las 4 poblaciones peruanas en estudio.

5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La comprobación de la desviación de equilibrio de Hardy – Weinberg se puede llevar a cabo utilizando la prueba de χ^2 de Pearson (Moore 2005); para ello, se obtuvieron los valores esperados de las frecuencias genotípicas de las 4 poblaciones en estudio y estos fueron comparados con los valores observados en el estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba Chi cuadrado (χ^2) de Pearson entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas.

MONSEFÚ				MOCHE			
Genotipo	Obs.	Esp.	(O-E) ² /E	Genotipo	Obs.	Esp.	(O-E) ² /E
II	16	16.081	0.000408	II	22	21.200	0.03018868
ID	3	2.838	0.00924736	ID	9	10.600	0.24150943
DD	0	0.081	0.081	DD	2	1.200	0.53333333
χ^2	0.09065			χ^2	0.80503		
<i>p-val</i>	1.0000			<i>p-val</i>	0.5719		
HUACHO				LIMA			
Genotipo	Obs.	Esp.	(O-E) ² /E	Genotipo	Obs.	Esp.	(O-E) ² /E
II	21	19.603	0.09955665	II	23	21.757	0.07101388
ID	12	14.795	0.52801791	ID	24	26.487	0.23351716
DD	4	2.603	0.74975375	DD	9	7.757	0.19918126
χ^2	1.37733			χ^2	0.50371		
<i>p-val</i>	0.4012			<i>p-val</i>	0.5738		

$p = 0.05$, grados de libertad = 2

El χ^2 teórico con un $p=0.05$ y grados de libertad (g.l) igual a 2 es de 5.991. La población de Monsefú obtuvo un χ^2 de 0.09065, la población de Moche obtuvo 0.80503, la población de Huacho 1.37733 y la población de Lima 0.50371. Se observa que las cuatro poblaciones mencionadas obtuvieron un χ^2 menor al teórico.

Por otro lado, los resultados de *p-value* obtenidos por el programa GENEPOP de las poblaciones de Monsefú, Moche, Huacho y Lima fueron 1.0000, 0.5719, 0.4012 y 0.5738 respectivamente. Las cuatro poblaciones presentan *p-value* > 0.05.

Por los resultados de X^2 y p -value se considera que los valores observados no difieren de los esperados. La diferencia que se encuentra entre ambos valores es mínima y se debe solamente al azar. Por lo tanto, las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy - Weinberg.

En la tabla 8 se muestran las frecuencias genotípicas de los resultados obtenidos en la presente tesis y los valores obtenidos en estudios poblacionales dentro del continente americano.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas de otros estudios poblacionales dentro del continente americano y las 4 poblaciones en estudio.

Estudio	Poblaciones	N	Frecuencias genotípicas		
			II	ID	DD
Zorrilla, et al., 2006	Montevideo (Uruguay)	108	0.185	0.509	0.306
Rupert et al., 2003	Península de Yucatán (México)	51	0.53	0.41	0.05
	Ollantaytambo (Perú)	111	0.50	0.45	0.06
Lizaraso S. et al., 2002b	Lima (Perú)	238	0.43	0.46	0.11
Tesis	Monsefú (Perú)	19	0.84	0.16	0
	Moche (Perú)	33	0.67	0.27	0.06
	Huacho (Perú)	37	0.57	0.32	0.11
	Lima (Perú)	56	0.41	0.43	0.16

Los valores mostrados en la tabla 8 fueron comparados mediante análisis X^2 que se observan en la tabla 9. Mediante este análisis se detectó que la población de Monsefú tiene diferencia significativa con todos los otros estudios poblacionales dentro del continente americano. La población de Moche no tiene diferencia significativa con las poblaciones de la Península de Yucatán (Mexico) y Ollantaytambo (Perú), pero sí con las poblaciones de Montevideo y un estudio anterior en Lima (2002). La población de Huacho no tiene diferencia significativa con las poblaciones de Península de Yucatán

(Mexico), Ollantaytambo (Perú) y Lima (2002), pero sí con la población de Montevideo. En la muestra de la población de Lima se detectó una diferencia significativa con las poblaciones de Montevideo (Uruguay), Península de Yucatán (México) y Ollantaytambo-Cusco (Perú); sin embargo, no presentó diferencias significativas con el estudio realizado por Lizaraso et al. (2002b) realizado también en Lima (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas entre las 4 poblaciones peruanas en estudio y otros estudios poblacionales del continente americano, mediante análisis χ^2 o prueba exacta de Fisher.

Poblaciones	Monsefú (Perú)		Moche (Perú)		Huacho (Perú)		Lima (Perú)	
	χ^2	<i>p-val.</i>	χ^2	<i>p-val.</i>	χ^2	<i>p-val.</i>	χ^2	<i>p-val.</i>
Montevideo (Uruguay)	54.761	$p < 0.05$	51.416	$p < 0.05$	36.420	$p < 0.05$	19.942	$p < 0.05$
Península de Yucatán (México)	7.387	$p < 0.05$	2.754	NS	3.260	NS	15.279	$p < 0.05$
Ollantaytambo (Perú)	9.190	$p < 0.05$	4.138	NS	3.064	NS	10.417	$p < 0.05$
Lima (Perú)	13.364	$p < 0.05$	7.355	$p < 0.05$	3.078	NS	1.852	NS

(*) χ^2 teórico para $p = 0.05$ y $g.l = 2$ es 5.9915

5.4 Distancias genéticas

Se elaboró un árbol basado en distancias genéticas, considerando la diferencia de las secuencias del polimorfismo I/D del gen *ECA*. Para este análisis el término distancia se refiere a la medida resultante entre la comparación de las frecuencias génicas de las 4 poblaciones en estudio. Para ello se construyó la matriz de distancias (Tabla 10) mediante el método UPGMA. Este método realiza los cálculos basados en la matriz de distancias y no directamente sobre las secuencias.

Tabla 10. Matriz de distancias genéticas *Fst* (Índice de Nei)

	MONSEFÚ	MOCHE	HUACHO	LIMA
MONSEFÚ	0.000000			
MOCHE	0.012063	0.000000		
HUACHO	0.036541	0.006476	0.000000	
LIMA	0.107222	0.045642	0.017429	0.000000

El árbol generado por el método UPGMA (denominado fenograma) (Figura 13) representa la relación evolutiva entre las poblaciones. Cada punto de unión (1,2 y 3) corresponde a un ancestro común hipotético en el desarrollo evolutivo del polimorfismo I/D de *ECA*. Cada rama representa la distancia genética entre las especies que resulta de los cálculos realizados en la matriz de distancias (Acero, 2007).

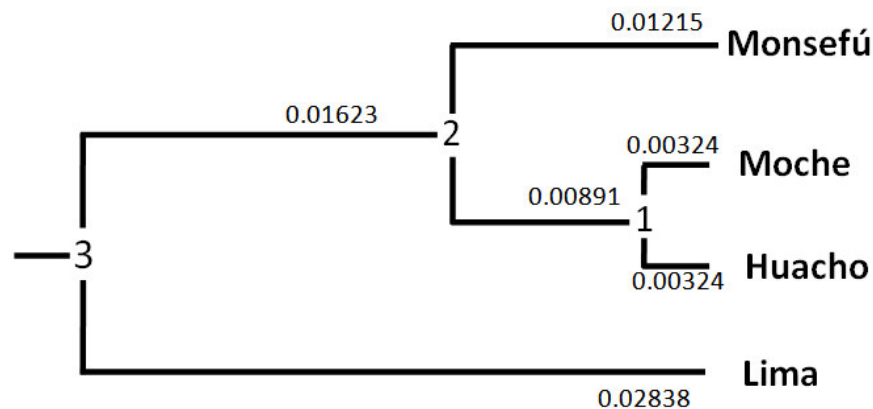


Figura 13. ÁRBOL DE DISTANCIAS GENÉTICAS. Elaborado entre las 4 poblaciones muestreadas por el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) en NEIGHBOR – PHYLIP 3.695. (Anexo 10.5)

En el árbol de distancias genéticas se observa 3 *clusters*, el primero conformado por las poblaciones de Moche y Huacho; el segundo, por el cluster 1 y la población de Monsefú y el tercero, por las poblaciones anteriormente mencionadas y la población de Lima. Sin embargo, comparando los valores de la matriz de distancias se verifica que la diferenciación genética entre las poblaciones se considera pequeña <0.05 , exceptuando a Lima que la diferencia genética con Monsefú se considera moderada (0.05 – 0.15).

6. DISCUSIÓN

El estudio de marcadores moleculares relacionados a polimorfismos genéticos que están involucrados o que generan una predisposición individual o familiar a padecer algún tipo de enfermedad, permitirá tener criterios válidos de diagnóstico o pronóstico, conocido como estimativa de riesgo. El polimorfismo I/D de *ECA* al ser una secuencia *Alu* relativamente reciente no es una secuencia conservada, por lo tanto es polimórfica; en tal sentido es muy útil como marcador molecular en poblaciones humanas (Antunez-de-Mayolo et al., 2002).

Desde el primer reporte del polimorfismo I/D de *ECA* en 1990, surgió un interés especial en estudiar la asociación entre este polimorfismo y los niveles plasmáticos de la *ECA* y, en consecuencia, con el papel que esta enzima desempeña en los sistemas de regulación donde interviene: Sistemas Renina – Angiotensina y Cinina - Calicreína. Estudios dirigidos a dilucidar una posible relación entre el alelo D de este polimorfismo con enfermedades vinculadas a defectos en la regulación de la presión arterial (estudios tipo caso-control), enfermedades cardiovasculares, nefropatías, etc., han tenido resultados contradictorios entre una población y otra.

Así se tiene que la frecuencia del alelo D es mucho menor en asiáticos que en caucásicos (Hsieh et al., 2000). Estudios en Latinoamérica también han mostrado distintos resultados. En un estudio en Montevideo, Uruguay realizado por Zorrilla et al., (2006) se reporta que la frecuencia del alelo D fue mayor que la del alelo I, este fue un resultado inesperado al ser comparado con poblaciones asiáticas y con otras poblaciones latinoamericanas (Ollantaytambo, Perú y Península de Yucatán, México) donde el alelo predominante es el alelo I, encontrándose similitud entre esta población uruguaya y poblaciones europeas (Francia, Austria y Holanda) donde el alelo predominante es el alelo D, este resultado podría explicarse por una ascendencia

genética caucásica en la mayoría de la población montevideana (86%-96% de genes de origen europeo, 1%-7% indoamericano y 4%-11% africano) (Zorrilla et al., 2006).

En el presente estudio la frecuencia del alelo D fue baja en comparación a la frecuencia al alelo I para las cuatro poblaciones estudiadas (Tabla 6 y Figura 12): Monsefú = 7.9 %, Moche = 19.7%, Lima = 37.5%, Huacho = 27.0%; estos valores bajos del alelo D concuerdan con los obtenidos en otros estudio de poblaciones peruanas donde la frecuencia es de alrededor del 27% (Rupert et al., 2003; Descailleaux et al., 2008), a excepción de Lima donde la frecuencia del alelo I aumenta (37.5%) (Lizaraso S. et al., 2002b; Descailleaux et al., 2008).

Por otro lado, los valores de las frecuencias genotípicas encontradas en las poblaciones trabajadas (Tabla 8) se observan que están muy cercanos a los valores estimados en otros estudios poblacionales en Perú y México: $II \geq 50\%$, $20 < ID < 40$ y $DD \leq 11\%$ (Rupert et al., 2003; Descailleaux et al., 2008), nuevamente es Lima la excepción donde el genotipo ID es el predominante, mostrando una similitud con resultados obtenidos anteriormente en muestras poblacionales limeñas, así como en poblaciones con ascendencia caucásica como la montevideana (Lizaraso S. et al., 2002b; Rupert et al., 2003; Zorrilla et al., 2006).

Sin embargo, el análisis de χ^2 (Tabla 9) realizado en este estudio demostró que existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por Rupert et al. (2003) (Península de Yucatán (México) y Ollantaytambo (Perú)) y dos de las poblaciones del presente estudio, Monsefú y Lima y, la inexistencia de la misma entre las poblaciones de Moche y Huacho; esto se debe a que la población de Lima presenta al genotipo ID como el predominante y que la población de Monsefú tiene valores muy extremos puesto que no presentó genotipo DD y el genotipo II es muy alto (84 %). Además, el análisis χ^2 detectó una diferencia significativa entre las 4 poblaciones analizadas en esta investigación y la población de Montevideo reportada por Zorrilla et al. (2006), a la

cual se le atribuye mayor similitud a una población netamente europea que a una población mestiza, determinando de esta forma que el comportamiento del polimorfismo I/D de *ECA* es totalmente diferente en un país mestizo de Latinoamérica que un país con orígenes caucásicos.

Al observar el árbol de distancias genéticas (Figura 13) las poblaciones de Moche y Huacho conforman un mismo *cluster*, encontrándose menos divergencia entre ellas. A su vez, entre estas dos poblaciones y la población de Monsefú, existe menor diferencia genética que la encontrada con la población de Lima. Este resultado podría estar relacionado con la ubicación geográfica y su demografía, ya que estas características podrían influir en la variación del flujo génico. Sin embargo, comparando los valores de la Matriz de distancias (Tabla 10) con la tabla de rango de valores *Fst* (Tabla 2) se verifica que la diferenciación genética entre las poblaciones se considera pequeña <0.05 , exceptuando a Lima ya que la diferencia genética con Monsefú se considera moderada ($0.05 - 0.15$).

Respecto a la población de Lima, se debe tener en cuenta que esta ciudad no solo es la más poblada del país; sino también, es la segunda ciudad con mayor cantidad de movimiento migratorio después de la ciudad de Tacna (Superintendencia Nacional de Migraciones 2015). Además, en el Perú a lo largo de los años, la proporción poblacional amerindia ha tenido un continuo retroceso y ya no hay una mayoría étnica absoluta sino, un conjunto de minoría raciales y étnicas dispersadas a lo largo del país (Degregori 2004).

El polimorfismo I/D de *ECA* en todas las poblaciones estudiadas se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que se consideraría que este polimorfismo actualmente no se encuentra bajo una presión de selección de importancia y, por tanto, no es esperable un cambio en las frecuencias observadas por el momento.

Las contradicciones entre los estudios que relacionan al alelo D con cierto tipo de enfermedades, principalmente las cardiovasculares, pone en manifiesto que el papel del genotipo I/D de *ECA* tiene una dependencia en la población muestreada, ya que la prevalencia de los alelos I y D varían entre poblaciones asiáticas, europeas, norteamericanas y latinoamericanas.

Finalmente, un estudio de prevalencia, como el presentado en esta tesis, brinda una visión más general de la evolución de este gen en nuestra población, a diferencia de lo que sería un estudio caso-control, al ser su aporte más limitado por ser válido solo en la población estudiada y para cada enfermedad en particular.

7. CONCLUSIONES

- El genotipo más frecuente del polimorfismo I/D de *ECA* en tres de las cuatro poblaciones analizadas (Monsefú, Moche y Huacho) es II, concordando con lo esperado para poblaciones latinoamericanas.
- La población limeña presenta el genotipo ID como el más frecuente, concordando este resultado con un estudio anterior realizado en Lima.
- El alelo I del gen *ECA* es el más frecuente en las cuatro poblaciones analizadas. Resultado semejante a lo reportado en poblaciones asiáticas y opuesto a lo obtenido en poblaciones europeas donde el alelo D es el predominante.
- Las cuatro poblaciones analizadas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

- Al generar el árbol de distancias genéticas se obtuvo 3 *clusters*; sin embargo, la diferenciación genética entre las poblaciones se considera pequeña <0.05 , exceptuando a Lima que la diferencia genética con Monsefú se considera moderada (0.05 – 0.15).

8. RECOMENDACIONES

Puesto en manifiesto la controversia respecto al polimorfismo I/D del gen *ECA*, se recomienda continuar con estudios de prevalencia de las frecuencias tanto génicas como genotípicas dentro de las poblaciones peruanas.

También se recomienda continuar con este tipo de estudio exploratorio con otros polimorfismos que pueden ser considerados marcadores moleculares y que además puedan estar relacionados con enfermedades crónicas o cuadros mórbidos.

En el caso del polimorfismo I/D de *ECA* los resultados obtenidos en trabajos como la presente tesis son informativos y funcionan como precedente para tener en cuenta la prescripción de medicamentos (inhibidores) como parte de un panel de variantes y haplotipos de *ECA*, así como varios otros genes en el *SRA* y vías relacionadas.

Por lo tanto, es recomendable ampliar este estudio, incrementando el tamaño muestral y aumentando la cantidad de poblaciones, para abarcar al máximo todo el territorio peruano.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ ACERO BARRAZA, Sandra Milena. "Algoritmo para análisis filogenético: UPGMA". Asesor: Eduardo Enrique Zurek Varela PhD. Tesis Título Profesional. Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia, 2007.
- ✓ ALFALAH M, Parkin ET, Jacob R, Sturrock ED, Mentele R, Turner AJ, et al. A point mutation in the juxtamembrane stalk of human angiotensin I-converting enzyme invokes the action of a distinct secretase. J Biol Chem. 15 de junio de 2001;276(24):21105-9.
- ✓ ALHENC-GELAS F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. J Lab Clin Med. enero de 1991;117(1):33-9.
- ✓ ANTUNEZ-DE-MAYOLO G, Antunez-de-Mayolo A, Antunez-de-Mayolo P, Papiha SS, Hammer M, Yunis JJ, et al. Phylogenetics of worldwide human populations as determined by polymorphic Alu insertions. ELECTROPHORESIS. 1 de octubre de 2002;23(19):3346-56.
- ✓ BATZER MA, DEININGER PL, Hellmann-Blumberg U, Jurka J, Labuda D, Rubin CM, et al. Standardized nomenclature for Alu repeats. J Mol Evol. 1 de enero de 1996;42(1):3-6.
- ✓ BATZER MA, DEININGER PL. Alu repeats and human genomic diversity. Nat Rev Genet. mayo de 2002;3(5):370-9.
- ✓ CASANUEVA CALERO K, Ferreira Capote R. Characterization of the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in a sample of Cuban population. Rev Cuba Med. diciembre de 2011;50(4):348-58.

- ✓ CASTELLON R, Hamdi HK. Demystifying the ACE polymorphism: from genetics to biology. *Curr Pharm Des.* 2007;13(12):1191-8.

- ✓ CHUNG C-M, Wang R-Y, Fann CSJ, Chen J-W, Jong Y-S, Jou Y-S, et al. Fine-Mapping Angiotensin-Converting Enzyme Gene: Separate QTLs Identified for Hypertension and for ACE Activity. *PLoS ONE* [Internet]. 4 de marzo de 2013 [citado 4 de marzo de 2014];8(3). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3587614/>

- ✓ CÓDIGO CIVIL PERUANO. Título V: capacidad e incapacidad de ejercicio (Artículo 42 al 46). Recuperado a partir de: <http://spij.minjus.gob.pe/CLP/contenidos.dll?f=templates&fn=default-codcivil.htm&vid=Ciclope:CLPdemo>

- ✓ CÓRDOVA JHH, Fujita R, Sandoval J, Descailleaux J, Velásquez M, Távara C, et al. Divergencia genética en poblaciones peruanas detectada a partir de las frecuencias haplotípicas del mtDNA y del gen nuclear MBL. *An Fac Med.* 20 de febrero de 2011;72(1):51-9.

- ✓ COSENSO-MARTIN LN, Vaz-de-Melo RO, Pereira LR, Cesarino CB, Yugar-Toledo JC, Cipullo JP, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism, 24-h blood pressure profile and left ventricular hypertrophy in hypertensive individuals: a cross-sectional study. *Eur J Med Res.* 2015;20(1):74.

- ✓ CRISAN D, Carr J. Angiotensin I-Converting Enzyme. *J Mol Diagn JMD.* agosto de 2000;2(3):105-15.

- ✓ DAGAN T, Sorek R, Sharon E, Ast G, Graur D. AluGene: a database of Alu elements incorporated within protein-coding genes. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2004;32(Database issue):D489-92.

- ✓ DANSER AHJ, Schalekamp MADH, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GAJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme in the Human Heart Effect of the Deletion/Insertion Polymorphism. *Circulation*. 15 de septiembre de 1995;92(6):1387-8.

- ✓ DAUGHERTY A, Poduri A, Chen X, Lu H, Cassis LA. Genetic Variants of the Renin Angiotensin System: Effects on Atherosclerosis in Experimental Models and Humans. *Curr Atheroscler Rep*. mayo de 2010;12(3):167-73.

- ✓ DE LA SERNA F, Peral de Bruno M. Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. En: de la Serna F. *Insuficiencia Cardíaca Crónica*. 3a. Edición. Argentina: Federación Argentina de Cardiología; 2010. p. 49-82

- ✓ DESCAILLEAUX J, Velasquez M, Tavera C, Vásquez J, Oliveros N, Cajavilca L, Cotos D, et al. Estimativa de distancias genéticas en 4 poblaciones peruanas a partir de las frecuencias alélicas I/D ACE y T235M. Libro de resúmenes XVII RC ICBAR. Agosto 2008. Sección V – pág. 81.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xvii/cap07.pdf

- ✓ DEGREGORI I. C., De Fondo - Peru: identidad, nación y diversidad cultural [Internet-Mayo, 2004]. [citado 5 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: http://interculturalidad.org/numero01/b/arti/b_dfo_030404.htm

- ✓ ESTHER CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, et al. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*. 15 de mayo de 1997;99(10):2375-85.

- ✓ FERREIRA SH. Bradykinin-Potentiating Factor. En: Erdős EG, Back N, Sicuteri F, Wilde AF, editores. *Hypotensive Peptides* [Internet]. Springer Berlin

Heidelberg; 1966 [citado 30 de agosto de 2015]. p. 356-67. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-94965-4_35

- ✓ GANGULY A, Dunbar T, Chen P, Godmilow L, Ganguly T. Exon skipping caused by an intronic insertion of a young Alu Yb9 element leads to severe hemophilia A. *Hum Genet.* septiembre de 2003;113(4):348-52.
- ✓ GARD PR. Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 20 de marzo de 2010;1(2):145-57.
- ✓ GROVER D, Majumder PP, B Rao C, Brahmachari SK, Mukerji M. Nonrandom distribution of alu elements in genes of various functional categories: insight from analysis of human chromosomes 21 and 22. *Mol Biol Evol.* septiembre de 2003;20(9):1420-4.
- ✓ HA S-K. ACE insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: clinical implications of genetic information. *J Diabetes Res.* 2014;2014:846068.
- ✓ HSIEH MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, et al. Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* julio de 2000;15(7):1008-13.
- ✓ HUBERT C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem.* 15 de agosto de 1991;266(23):15377-83.

- ✓ INEI - Censos Nacionales 2007: XI de Población y VI de Vivienda - Cuadros Estadísticos [Internet]. [citado 25 de marzo de 2016]. Recuperado a partir de: <http://censos.inei.gob.pe/cpv2007/tabulados/#>

- ✓ KEHOE PG, Wilcock GK. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol.* abril de 2007;6(4):373-8.

- ✓ KOHNO M, Yokokawa K, Minami M, Kano H, Yasunari K, Hanehira T, et al. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and regression of left ventricular hypertrophy in patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med.* mayo de 1999;106(5):544-9.

- ✓ KOYAMA RG, Castro RMRPS, De Mello MT, Tufik S, Pedrazzoli M. Simple Detection of Large InDeLS by DHPLC: The ACE Gene as a Model. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2008 [citado 21 de agosto de 2015];2008. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2358980/>

- ✓ LENNÉSTÅL R, Otterblad Olausson P, Källén B. Maternal use of antihypertensive drugs in early pregnancy and delivery outcome, notably the presence of congenital heart defects in the infants. *Eur J Clin Pharmacol.* junio de 2009;65(6):615-25.

- ✓ LIN H, Lin D, Zheng C-Q. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism associated with allergic rhinitis susceptibility: evidence from 1410 subjects. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* diciembre de 2014;15(4):593-600.

- ✓ LIZARASO S. F, Rivara R. G, Torres E, Fujita A. R. Presencia del genotipo D/D del gen de enzima convertidora de angiotensina y del genotipo 235T del gen de

angiotensinógeno como factores de riesgo para sufrir un evento coronario agudo. Revista Peruana de Cardiología. 2002a, Vol. 28, N°1.

- ✓ LIZARASO S. F, Medina P. F, Salazar C. M, Diestefano U. F, Fujita A. R. Evaluación de la prevalencia de los genes polimórficos de la enzima convertidora de angiotensina y del angiotensinógeno en hipertensos primarios de la población peruana. Horiz Méd Impresa. diciembre de 2002b;2(1/2):6-26.
- ✓ MONTGOMERY HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, et al. Human gene for physical performance. Nature. 21 de mayo de 1998;393(6682):221-2.
- ✓ MOORE DS. Estadística aplicada básica. Antoni Bosch editor; 2005. 884 p.
- ✓ NEI M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. Genetics. julio de 1978;89(3):583.
- ✓ OHMICH N, Iwai N, Uchida Y, Shichiri G, Nakamura Y, Kinoshita M. Relationship between the response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. Am J Hypertens. agosto de 1997;10(8):951-5.
- ✓ PARENICA J, Goldbergova MP, Kala P, Jarkovsky J, Poloczek M, Manousek J, et al. ACE gene insertion/deletion polymorphism has a mild influence on the acute development of left ventricular dysfunction in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary PCI. BMC Cardiovasc Disord. 17 de diciembre de 2010;10:60.
- ✓ PÉREZ LG, Sánchez MAA, Miranda AMP, Garcia JAP, others. Utilidad de las inserciones Alu en los estudios de mestizaje. Antropo. 2007;(14):28-36.

- ✓ PILATI M, Cicoira M, Zanolla L, Nicoletti I, Muraglia S, Zardini P. The Role of Angiotensin-Converting Enzyme Polymorphism in Congestive Heart Failure. *Congest Heart Fail.* 2004;10(2):87-95.

- ✓ RASYID H, Bakri S, Yusuf I. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms, blood pressure and pulse pressure in subjects with essential hypertension in a South Sulawesi Indonesian population. *Acta Medica Indones.* octubre de 2012;44(4):280-3.

- ✓ RIGAT B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* octubre de 1990;86(4):1343-6.

- ✓ RIGAT B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 25 de marzo de 1992;20(6):1433.

- ✓ ROTH SM. *Genetics Primer for Exercise Science and Health.* Human Kinetics; 2007. 198 p.

- ✓ RUPERT JL, Kidd KK, Norman LE, Monsalve MV, Hochachka PW, Devine DV. Genetic polymorphisms in the Renin-Angiotensin system in high-altitude and low-altitude Native American populations. *Ann Hum Genet.* enero de 2003;67(Pt 1):17-25.

- ✓ SANZ BG. *De la sociedad española y de otras sociedades: libro homenaje a Amando de Miguel.* CIS; 2013. 649 p.

- ✓ SASAKI M, Oki T, Iuchi A, Tabata T, Yamada H, Manabe K, et al. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. J Hypertens. diciembre de 1996;14(12):1403-8.
- ✓ SAYED-TABATABAEI FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JCM. ACE Polymorphisms. Circ Res. 5 de diciembre de 2006;98(9):1123-33.
- ✓ SKEGGS LT, Kahn JR, Shumway NP. THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. J Exp Med. 29 de febrero de 1956;103(3):295-9.
- ✓ SMITH CG, Vane JR. The Discovery of Captopril. FASEB J. 5 de enero de 2003;17(8):788-9.
- ✓ STAVROULAKIS GA, Makris TK, Krespi PG, Hatzizacharias AN, Gialeraki AE, Anastasiadis G, et al. Predicting response to chronic antihypertensive treatment with fosinopril: the role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother. agosto de 2000;14(4):427-32.
- ✓ STONEKING M, Fontius JJ, Clifford SL, Soodyall H, Arcot SS, Saha N, et al. Alu Insertion Polymorphisms and Human Evolution: Evidence for a Larger Population Size in Africa. Genome Res. noviembre de 1997;7(11):1061-71.
- ✓ SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE MIGRACIONES | Superintendencia Nacional de Migraciones [Internet]. [citado 5 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <https://www.migraciones.gob.pe/>

- ✓ TAVAKOLI H. A Dictionary of Research Methodology and Statistics in Applied Linguistics. Rahnama Press; 2013. 767 p.

- ✓ THORN CF, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for angiotensin-converting enzyme. Pharmacogenet Genomics. febrero de 2010;20(2):143-6.

- ✓ ZHANG Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. PloS One. 2012;7(10):e46495.

- ✓ ZHOU T-B, Chen Z, Qin Y-H, Xu H-L. Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism with susceptibility of minimal change nephrotic syndrome in Asians: a meta-analysis. J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS. septiembre de 2012;13(3):407.

- ✓ ZORRILLA P, Mimbacas A, Gascue C, Javiel G, Cardoso H. Prevalencia del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la población de Montevideo. Rev Médica Urug. marzo de 2006;22(1):17-21.

10. ANEXOS

10.1 Ubicación geográfica de las 4 poblaciones en estudio



10.2 Secuencia nucleotídica (FASTA) del Intrón 16 del gen ECA

```
>gi|28921|emb|X62855.1| H.sapiens angiotensin I-converting
enzyme gene (intron 16)
GTGAGAGCTCATGTGCAGGCTGAGTGAGAGGCGAGGGCTGGGACTGGCATGGGGCCCCGGGGTGTGGGT
GAGAGCACAGAGTTGGGCTCCCTCGCTCTTGGGGTCAGCGTGCCAGGAAATGCCCTTCTTGTGTTTTCC
ACGAGGGGGGCTTCTCTGCCCCACTGAGAGCCGGCACCTACTTCATACCATGCCCCGATCAGCTGCCCTC
CCTCAGAACCGCCCTCTGCTTAAGGGTGTCCACTCTCTCTGTCTCTCTGCATGCCGCCCTCAGAGCA
GCGGGATCTCAAAGTTATATTTTCATGGGCTTGGACTCCAAATGGGGGAACTCGGGGACACTAGCTCCCC
CCGGCCTCCTTTTCGTGACCCTGCCCTTGAATTCCTCACCTTCTCTGTCTTTCTGAGCCCTCTCCCAGC
ATGTGACTGATAAGGAAATTGAGTCACACAGCCCTGAAAGCGCCAGACTAGAACCTGAGCCTCTGATTC
CTCTCACTTCCCTCCCTACCTGCCACTTCTTACTGGATAGAAGTAGACAGCTCTTGACTGTCTCTTT
TCTCCCCACTGGCTGGTCTTCTTAGCCCCAGCCCGTTTGAAGAGCTCACCCCGACACAAGGACCCGC
ACACAGATACCTCCAGCTCCCTCTCAACCCACCTTTTCCAGGGTTGGAGAATTGAGGCATAAACATTC
TTCCATGAGGAATCTCCACCCAGAAATGGGTCTTTCTGGCCCCAGCCAGCTCCACATTAGAACAATG
ACAAATAGAAGGGGAAATGGAAATAAACAGGAGAAACGGTTTCCCAGGACAGGGTTTGGCCTACAAGT
TGTGGATGTGGGTACCATGCCAAGTGTGAGGGGAGGCTGGCCGGGTGTGGTGGCTCATGCTCTAATCCC
AGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGAGTAGATCACTTGAGGCCGGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACATGG
TGAAACCCCATCTGTACTAAAAATACAAAAGTTAGCTGGGCGTGGTGGTAGATGCCTGTAGTCCCAGCTA
CTTGGGAGGCTGAGGCATGAGAATCGCTTGAGCCAGCCAGGCAATACAGCAAGACCCCGTCTCTACAA
ATAAAATACAAAAAATTAGTTGGATGTGGTGGTGCATGCCTGTAGTCTAGCTGCTAGGGAGGCTGAGAT
GGAAGGATTGCTTGAGCCTGGGAGGTCAAGGCTGCAGTGAGCCGAGATGGCGCCACTGCACTCCAGCCTG
GGCAACAGAGTGAGACCCTGTCTCAGAAAGAAAAAAGAGGAGGAGAGAGACTCAAGCACGC
CCCTCACAGGACTGCTGAGGCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGTGCCAGGCCGGGGACTCTGTAAGCCAC
TGCTGGAGACCACTCCCATCCTTTCTCCCATTTCTCTAGACCTGTCTGCCTATACAGTCACTTTTTTTTTT
TTTTTGAGACGAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGGGATCTCGGCTCACTGCAACG
TCCGCCTCCCGGGTTACGCCATTCTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACCACAGCGCCGCCAC
TACGCCCGCTAATTTTTTGTATTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCCTTTTAGCCGGGATGGTCTCGAT
CTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGATACAGTCACTT
TTATGTGGTTTCGCCAATTTTATTCAGCTCTGAAATTCCTCTGAGCTCCCTTACAAGCAGAGGTGAGCT
AAGGGCTGGAGCTCAAGCCATTCAACCCCTACCAAG
```

GenBank: X62855.1

10.3 Registro del polimorfismo I/D de ECA en NCBI:

NM_000789.3(ACE):c.2306-117_2306-116insAF118569.1:g.14094_14382

NM_000789.3(ACE):c.2306-117_2306-116insAF118569.1:g.14094_14382

Variant type:	Insertion
Cytogenetic location:	17q23
Genomic location:	Chr17:63488531 - 63488532 (on Assembly GRCh38) Chr17:61565892 - 61565893 (on Assembly GRCh37)
Other names:	ACE/I/D polymorphism INS/DEL (rs1799752)
HGVS:	NG_011648.1:g.16459_16460insAF118569.1:g.14094_14382 NM_000789.3:c.2306-117_2306-116insAF118569.1:g.14094_14382 NC_000017.11:g.63488531_63488532insAF118569.1:g.14094_14382 (GRCh38) NC_000017.10:g.61565892_61565893insAF118569.1:g.14094_14382 (GRCh37)
Note:	287-bp Insertion/Deletion polymorphism (I/D) in intron 16 of the ACE gene.
Links:	OMIM: 106180.0001 dbSNP: 4340
NCBI 1000 Genomes Browser:	rs4340

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/18061/>

10.4 Genotipos del polimorfismo I/D de las poblaciones muestreadas

TABLA 11. GENOTIPOS I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN LIMA

Código	Genotipo	Código	Genotipo	Código	Genotipo
001	ID	020	II	039	DD
002	II	021	II	040	DD
003	II	022	DD	041	II
004	II	023	ID	042	ID
005	II	024	DD	043	ID
006	ID	025	ID	044	ID
007	II	026	II	045	II
008	II	027	II	046	II
009	II	028	ID	047	II
010	ID	029	ID	048	ID
011	ID	030	II	049	DD
012	DD	031	ID	050	ID
013	ID	032	II	051	ID
014	II	033	ID	052	II
015	ID	034	II	053	DD
016	ID	035	II	054	ID
017	ID	036	ID	055	DD
018	ID	037	II	056	ID
019	DD	038	II		

N = 56

TABLA 12. GENOTIPOS I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN MONSEFÚ

Código	Genotipo	Código	Genotipo	Código	Genotipo
001	II	008	ID	015	II
002	II	009	II	016	II
003	II	010	II	017	ID
004	II	011	II	018	ID
005	II	012	II	019	II
006	II	013	II		
007	II	014	II		

N = 19

TABLA 13. GENOTIPOS I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN MOCHE

Código	Genotipo	Código	Genotipo	Código	Genotipo
001	DD	012	II	023	ID
002	II	013	II	024	II
003	II	014	II	025	ID
004	ID	015	II	026	ID
005	II	016	ID	027	DD
006	II	017	II	028	II
007	II	018	II	029	ID
008	II	019	II	030	II
009	II	020	II	031	ID
010	II	021	ID	032	II
011	ID	022	II	033	II

N = 33

TABLA 14. GENOTIPOS I/D DEL GEN *ECA* EN LA POBLACIÓN HUACHO

Código	Genotipo	Código	Genotipo	Código	Genotipo
001	II	014	II	027	II
002	II	015	ID	028	ID
003	ID	016	ID	029	ID
004	II	017	ID	030	II
005	II	018	DD	031	II
006	II	019	II	032	II
007	ID	020	II	033	DD
008	ID	021	DD	034	II
009	II	022	II	035	II
010	ID	023	DD	036	II
011	II	024	ID	037	II
012	ID	025	II		
013	II	026	ID		

N = 37

10.5 Árbol de distancias genéticas entre las 4 poblaciones, programa NEIGHBOR
– PHYLIP 3.695.

```

      4 Populations
Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.695

UPGMA method
Negative branch lengths allowed

      +MONSEFU  0
    +-2
    ! ! +MOCHE  0
  --3 +-1
    !   +HUACHO  0
    !
    +-LIMA      0

```

From	To	Length	Height
----	--	-----	-----
3	2	0.01623	0.01623
2	MONSEFU	0.01215	0.02838
2	1	0.00891	0.02514
1	MOCHE	0.00324	0.02838
1	HUACHO	0.00324	0.02838
3	LIMA	0.02838	0.02838

INFORMACIÓN SOBRE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

MUESTRA DE ADN CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN LOS PROYECTOS TITULADOS: “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GÉNICAS DEL GEN *SUPRESOR DE TUMORES(TP53)* EN POBLACIONES PERUANAS”, “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GENOTÍPICAS DEL GEN *MANNOSE-BINDING LECTIN (MBL2)* EN POBLACIONES PERUANAS” Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO INDEL (I/D) DEL GEN *ECA* EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS”.



**LAB. GENÉTICA HUMANA – FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS – UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN
MARCOS – 2014**

Presentación del Equipo de Trabajo

Somos el equipo del laboratorio de genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con dirección en: Calle Germán Amezaga 375 – Cercado de Lima, teléfono 6197000.

- Profesor principal DE, Ricardo Jaime DESCAILLEAUX DULANTO (M Sc. Jefe del Laboratorio).
- Profesora asociada DE, Margarita Rosa Eugenia VELÁSQUEZ REINOSO (Bióloga).
- Profesor asociado DE, Jesús CORDOVA SANTA GADEA (Biólogo).

El trabajo rutinario del laboratorio, está guiado por: La Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO, aprobada en 1997; La Declaración Internacional sobre los datos genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de Octubre del 2003; El Informe de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud sobre el control de la enfermedades genéticas; Documento EB116/3 del 21 de Abril del 2005 y la Comunicación 679 de la Comisión de las Comunidades Europeas sobre las Enfermedades Raras: un reto para Europa del 11 de Noviembre del 2008. Igualmente, todos los integrantes del servicio firmamos una Declaración de Confidencialidad, con respecto a los datos que manejamos durante nuestro trabajo.

Utilidad de este consentimiento

El propósito de este documento es proporcionarle la información necesaria para que Ud. libremente decida si desea donar una muestra de sangre para su posterior extracción del ADN. Por favor, lea la información que sigue y pregúntenos todo aquello que no entiende claramente. Una vez que esté seguro de haber comprendido cómo se toma la muestra de ADN y lo que se va a hacer con ella, Ud. debe decidir si desea que le tomemos una muestra de sangre.

¿Qué le estamos solicitando?

Que Ud. nos proporcione una muestra de sangre periférica de una vena de su brazo, de la cual, obtendremos su ADN para ser empleada en procedimientos o análisis de genética molecular (amplificación por PCR y electroforesis) con fines de investigación científica. La muestra que

nos proporcione la haremos anónima; es decir, retiraremos la identificación correspondiente a su nombre y solo registraremos el sexo y el año de su nacimiento.

¿En qué consiste la toma de muestra de sangre?

El ADN se encuentra en todas nuestras células, incluyendo las células blancas de la sangre periférica, que tomaremos de una de las venas de su brazo. Si Ud. estuviera de acuerdo, se le tomará una muestra de sangre. Para tener una idea, las personas tenemos alrededor de 3 500 mililitros de sangre, por ejemplo, en una donación se le extrae una o dos bolsas de 250 mililitros. A usted se le tomará una muestra que corresponde a una cucharada de sopa o 5 mililitros. No es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Es de uso exclusivo para estandarizar pruebas moleculares y para investigación en genética molecular. Recuerde que la muestra va a ser anónima luego de ser tomada y no se podrá identificar la suya entre las demás.

¿Se requiere información clínica?

Sí, se le preguntará por antecedentes personales, antecedentes familiares y aspectos clínicos relacionados con el estado de salud en general.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud.?

Las molestias que Ud. sentirá son algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja, o una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional.

¿Cuáles son los beneficios?

Usted contribuirá al desarrollo y estandarización de técnicas de genética molecular que nos permitirán conocer algunas características moleculares de la población peruana que puede ser de utilidad para las investigaciones científicas y/o el diagnóstico de enfermedades. No hay compensación económica por su participación en este estudio.

¿Es confidencial mi participación en este estudio?

Sí, su participación es confidencial, las muestras pasan a ser anónimas, no se entregan resultados ya que estas muestras se utilizarán para estandarizar técnicas y no son para el diagnóstico específico de alguna enfermedad. A sus datos personales (año de nacimiento y sexo), así como a la muestra de sangre se le será asignado un código de identificación para manejo interno en el laboratorio. Cuando los resultados de los trabajos se presentan para análisis estadístico u otros aspectos académicos de la Universidad, son manejados por personal institucional, conscientes de la confidencialidad. Si los resultados de estos estudios son publicados o presentados en ambientes científicos, su nombre no aparecerá.

En caso de preguntas adicionales ¿con quién podría contactar?

Ud. puede contactar:

Con el profesor principal DE, Ricardo Jaime Descailleaux Dulanto. MSc., Jefe del Laboratorio de genética Humana – UNMSM, al número 998-541980.

Una vez que esté seguro de haber entendido todo lo anterior y no tenga más preguntas, firme por favor la autorización o consentimiento informado para tomarle la muestra de sangre, poder extraer su ADN y emplearlo en los procedimientos explicados. La firma del consentimiento informado debe realizarse en presencia de un testigo. Ud. recibirá una copia de este documento y del consentimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE Y POSTERIOR EXTRACCIÓN DE ADN CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN LOS PROYECTOS TITULADOS: “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GÉNICAS DEL GEN *SUPRESOR DE TUMORES(TP53)* EN POBLACIONES PERUANAS”, “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GENOTÍPICAS DEL GEN *MANNOSE-BINDING LECTIN (MBL2)* EN POBLACIONES PERUANAS” Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO INDEL (I/D) DEL GEN *ECA* EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS”.



**LAB. GENÉTICA HUMANA – FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS – UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN
MARCOS – 2014**

Yo, _____, con DNI No. _____

Declaro que he sido informado(a) por el profesor DE Principal Ricardo Jaime DescailleauxDulanto, MSc. acerca de mi participación para desarrollar procedimientos moleculares para investigación en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y he tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que he considerado convenientes y aclarado todas mis dudas; estoy satisfecho (a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1.- Que se me extraiga una muestra de sangre para la implementación de procedimientos de genética Molecular en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM.

Firma:

Impresión digital

2.- Que (SI / NO) se almacene mi muestra de ADN en la ADNteca del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM.

Firma:

Impresión digital

Dirección o correo para informar conclusiones generales: _____
Profesional que toma el Consentimiento:

_____ DNI: _____

Firma:

Impresión digital

Testigo: _____ DNI: _____

Firma:

Impresión digital

10.7 Ficha de datos de los participantes



PROYECTOS: “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GÉNICAS DEL GEN *SUPRESOR DE TUMORES(TP53)* EN POBLACIONES PERUANAS”, “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GENOTÍPICAS DEL GEN *MANNOSE-BINDING LECTIN (MBL2)* EN POBLACIONES PERUANAS” Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO INDEL (I/D) DEL GEN *ECA* EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS”

FICHA DE DATOS DE LOS PARTICIPANTES VOLUNTARIOS EN EL PROYECTO.

Fecha: _____ Código: _____

N° de consentimiento informado: _____ N° de clave: _____

I. INFORMACIÓN GENERAL

Apellidos: _____

Nombres: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____ Edad: _____

Provincia: _____ Departamento: _____

N° de orden en la hermandad: _____ Estatura: _____ Peso: _____

Estado civil: _____ N° de hijos según sexo: Mujer _____ Varón _____

Nivel de educación: _____ Ocupación: _____

Enfermedades que ha sufrido y fecha de ocurrencia: _____

II. INFORMACIÓN FAMILIAR

Nombre del Padre: _____ Edad: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____

Ocupación: _____

Nombre de la madre: _____ Edad: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____

Ocupación: _____

N° de hijos: _____ Varones: _____ Mujeres: _____ Embarazos: _____ Abortos: _____

RESPONSABLE